

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MONIQUE MARIA LUCENA SURUAGY DO AMARAL

**PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E SUA RELAÇÃO COM A  
ESTEATOSE HEPÁTICA E O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS  
SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS PADRÃO**

Maceió

2012

MONIQUE MARIA LUCENA SURUAGY DO AMARAL

**PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E SUA RELAÇÃO COM A  
ESTEATOSE HEPÁTICA E O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS  
SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS PADRÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Nutrição da Universidade Federal de Alagoas  
como requisito à obtenção do título de Mestre  
em Nutrição.

Orientadora: Profa. Dra. Terezinha da Rocha  
Ataide

Co-Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lima de  
Oliveira

Maceió

2012

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

A458p Amaral, Monique Maria Lucena Suruagy do.  
Perfil em ácidos graxos do fígado e sua relação com a esteatose hepática e o perfil lipídico sérico de ratos submetidos a diferentes dietas padrão / Monique Maria Lucena Suruagy do Amaral. – 2012.  
100 f. : il.

Orientadora: Terezinha da Rocha Ataíde.

Co-Orientadora: Suzana Lima de Oliveira.

Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição Maceió, 2012.

Bibliografia: f. 88-90.

Apêndices: f. 91-99.

Anexo: f. 100.

1. Doença hepática. 2. Esteatose hepática. 3. Ácidos graxos. 4. Fígado gorduroso não alcoólico. 5. AIN-93. 6. Dieta comercial. 7. Experimentação animal. I. Título.

CDU:612.39:612.354



**MESTRADO EM NUTRIÇÃO  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**



Campus A. C. Simões  
BR 104, km 14, Tabuleiro dos Martins  
Maceió-AL 57072-970  
Fone/fax: 81 3214-1160

---

**PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE  
DISSERTAÇÃO**

**“PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E SUA RELAÇÃO  
COM A ESTEATOSE HEPÁTICA E O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO  
DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS PADRÃO”**

por

*Monique Maria Lucena Suruagy do Amaral*

A Banca Examinadora, reunida aos 28 dias do mês de fevereiro do ano de 2012, considera a candidata APROVADA.

Prof. Dra. Terezinha da Rocha Ataíde  
Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Alagoas  
(Orientadora)

Prof. Dra. Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos  
Hospital das clínicas – Universidade Federal de Pernambuco  
(Examinadora)

Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Instituto de Química e Biotecnologia – Universidade Federal de Alagoas  
(Examinador)

## **DEDICATÓRIA**

Dedicado a Deus, minha fonte de força e esperança, aos meus pais, Rogério e Sylvana, irmãos, Rú e Tita, e avós, Affonso e Déa, meus exemplos de simplicidade e amor puro, e ao meu amor, Ricardo, pelo companheirismo e apoio mais sincero.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr. Terezinha Ataíde pela orientação deste trabalho, confiança depositada e, principalmente, por seu exemplo de profissional e pessoa. Seus ensinamentos são além do acadêmico e seu amor ao que faz é percebido por todos com quem convive. Absolutamente, este encontro, orientadora-orientanda, não foi por acaso.

À Prof.<sup>a</sup> Dr. Suzana Lima de Oliveira pela co-orientação e atenção despendida durante a elaboração da dissertação;

Ao meu noivo Ricardo Aguiar pelos anos, os que passaram e os que virão, de companheirismo, amizade, amor e apoio;

Aos companheiros de pesquisa Airta Larissa, e em especial Ingrid Sofia e Nassib Bueno pela disponibilidade e ajuda em todos os momentos de elaboração do trabalho;

Aos companheiros de mestrado, em especial Rose Carolinne, por sempre me incentivar através de conversas e planos;

À minha amiga Fabíola Carneiro pela força, dicas sinceras e, principalmente, compreensão em todos os momentos de realização do trabalho;

Ao Prof. Dr. Joahnatan pelas análises cromatográficas e sua inestimável colaboração para a elaboração da dissertação;

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação da Faculdade de Nutrição pelo trabalho desempenhado durante o decorrer do mestrado;

Ao CNPQ, pela concessão de bolsa de mestrado.

*"Tudo tem seu apogeu e seu declínio.  
É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que  
supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela!  
Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!"*

*Chico Xavier*

## RESUMO GERAL

A esteatose hepática (EH) é caracterizada por acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, que excede em 5% o peso do fígado. Ocorre por uma falha do metabolismo lipídico hepático normal, devido a um defeito dentro do hepatócito ou à oferta de ácidos graxos (AG) ou carboidratos em excesso ao órgão, superando a capacidade de secreção de lipídios da célula. A EH já foi considerada uma manifestação benigna; contudo, esta condição é capaz de desencadear um amplo espectro de manifestações clínicas e patológicas, como a esteato-hepatite não alcoólica, que pode evoluir para cirrose, em até 25% dos casos. Em estudos com animais de experimentação, modificações dietéticas podem induzir o quadro de EH; no entanto, em trabalhos anteriores realizados pelo presente grupo de investigação, constatou-se o surgimento desta infiltração gordurosa em animais alimentados com dietas padrão, livres de modificações. Visando contribuir com a discussão do problema, esta dissertação apresenta um capítulo de revisão de literatura intitulado *Ácidos graxos e a doença do fígado gorduroso não-alcoólica* que, além de discutir o papel dos diferentes AG no contexto da doença do fígado gorduroso não-alcoólica, tratando, especialmente, da possível relação com a etiologia, a progressão e/ou a reversão da EH, discorre sobre a patogênese e a progressão da doença. E, um artigo de resultados, intitulado *Perfil em ácidos graxos do fígado e sua relação com a esteatose hepática e o perfil lipídico sérico de ratos submetidos a diferentes dietas padrão*, um estudo experimental com ratos *Wistar*, expostos a diferentes dietas padrão. Neste estudo, 40 ratos *Wistar* machos recém-desmamados foram distribuídos, conforme o tipo e o tempo de exposição às dietas, nos grupos: **AIN-93 1m** e **AIN-93 4m** (sob dieta AIN-93 por 1 ou 4 meses) e **DCo 1m** e **DCo 4m** (sob ração comercial por 1 ou 4 meses). Foi coletado sangue para análise bioquímica e, após o sacrifício dos animais, foi retirado o tecido hepático para histologia e posterior extração por solventes dos AG, que foram metilados com BF<sub>3</sub>/metanol. A análise dos ésteres metílicos dos AG foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A EH foi encontrada em 90% e 100% dos animais dos grupos AIN-93 1m e AIN-93 4m, respectivamente, em 20% dos animais do grupo DCo 4m e nenhum caso no grupo DCo 1m. O perfil lipídico sérico e os marcadores séricos de função e lesão hepática, diferentes da glicemia, não pareceram guardar relação com a EH. A análise do peso absoluto e do peso relativo do fígado, por sua vez, evidenciou a importância da EH para o aumento do órgão dos animais. Os AG heptadecanóico e araquidônico pareceram guardar relação com a exposição às diferentes dietas. Os níveis de ácido oléico foram mais elevados e os de esteárico, mais baixos, nos grupos expostos à dieta AIN-93, independente do tempo de exposição. Não foi observada diferença para os outros AG. As diferentes dietas exerceram influência sobre o perfil em AG do tecido hepático dos animais. Tal perfil guardou relação com a EH observada, particularmente em relação aos AG oléico e esteárico, bem como às associações entre os ácidos oléico, esteárico, palmítico e palmitoléico com o grau de EH, com possíveis repercussões sobre o prognóstico da doença.

**Palavras-chave:** Experimentação animal. Doença do fígado gorduroso não-alcoólica. Ácidos graxos. AIN-93. Dieta comercial.



## GENERAL ABSTRACT

Hepatic steatosis (HS) is characterized by accumulation of lipids in the cytoplasm of hepatocytes, which exceeds 5% of liver weight. Occurs due to failure of normal hepatic lipid metabolism due to a defect within the hepatocyte or the supply of fatty acids (FA) or excess carbohydrates to the liver, exceeding the capacity of the secretion of lipids in the cell. The HS was once considered a benign event, however, this condition is capable of triggering a broad spectrum of clinical and pathological manifestations, such as nonalcoholic steatohepatitis, which may progress to cirrhosis in up to 25% of cases. In studies with experimental animals, dietary changes may induce the HS, however, in previous work by this research group, has been found the appearance of fatty infiltration in animals fed with standard diets, free of modifications. To contribute to the discussion of the problem, this paper presents a literature review chapter titled *fatty acids and nonalcoholic fatty liver disease* that in addition to discussing the role of different FA in the context of nonalcoholic fatty liver disease, treating especially the possible relationship to the etiology, progression and / or reversal of HS, discusses the pathogenesis and disease progression. And an article by results entitled *fatty acid profile of the liver and its relation to hepatic steatosis and serum lipid profile in rats fed with different standard diets*, an experimental study with rats exposed to different standard dietary. In this study, 40 male weanling Wistar rats were divided, depending on the type and duration of exposure to diets in: AIN-93 1m and AIN-93 4m (on AIN-93 diet for 1 or 4 months) and DCo 1m and DCo 4m (under chow diet for 1 or 4 months) groups. Blood was collected for biochemical analysis and after sacrificing the animals, the liver tissue was removed for histology and subsequent solvent extraction of fatty acids, which were methylated with BF<sub>3</sub>/methanol. The analysis of methyl esters of fatty acids was performed by gas chromatography-mass spectrometry. The HS was found in 90% and 100% of the animals in AIN-93 1m and AIN-93 4m groups, respectively, 20% of the animals DCo 4m group and none in the DCo 1m. The serum lipid profile and serum markers of function and injury liver, other than glycemia, did not seem to be related to HS. Analysis of the absolute weight and relative liver, in turn, showed the importance of the HS to growth the organ of the animals. The FA heptadecanoic and arachidonic seem to be related to exposure to different diets. The levels of oleic acid were higher and of stearic lower in the groups exposed to the diet AIN-93, independent of the exposure time. No difference was observed for the other FA. The different diets influence on the profile in FA hepatic tissue of animals. This profile was related to the observed HS, particularly in relation to FA oleic and stearic acids, as well as associations between oleic, stearic, palmitic and palmitoleic with the degree of HS, with possible repercussions on the prognosis of the disease.

**Keywords:** Animal experimentation. Non-alcoholic fatty liver disease. Fatty acids. AIN-93. Chow.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cortes histológicos do fígado corados pelo método HE. Esteatose grau 0- ausência (A), grau 1- leve (B), grau 2- levemente moderado (C), grau 3- moderado (D), grau 4- grave (E) e grau 5- grave com presença de pseudocistos (seta) (F). Fonte: Silva et al. (2008) e Ataíde et al. (2009)..... 65
- Figura 2 - Correlação linear de Spearman entre o grau de esteatose hepática (GEH) e os ácidos graxos palmítico (C16:0; A), esteárico (C18:0; B), oléico (C18:1; C) e palmitoléico (C16:1; D)..... 71
- Figura 3 - Correlação linear de Pearson entre aspartato aminotransferase (AST) e o ácido palmítico (C16:0) (A) e entre alanina aminotransferase (ALT) e o ácido esteárico (C18:0) (B); correlação linear de Spearman entre gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) e o ácido graxo esteárico (C18:0) (C); correlação linear de Pearson entre o ácido graxo oléico (C18:1) e AST (D) e ALT (E)..... 72
- Figura 4 - Correlação linear de Pearson entre o peso absoluto do fígado (PAF) e o ácido graxo esteárico (C18:0) (A) e o ácido oléico (C18:1) (B)..... 73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição das dietas AIN-93G e AIN-93M.....	62
Quadro 2 - Composição da dieta comercial.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Variáveis bioquímicas séricas dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo4m.....	68
Tabela 2	- Frequência de esteatose hepática (EH), graus de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), peso absoluto (PAF) e peso relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m.....	69
Tabela 3	- Escores médios percentuais de ácidos graxos dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m.....	70
Tabela 4	- Valores médios percentuais de ácidos graxos do tecido hepático dos ratos dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m.....	70
Tabela 5	- Valores percentuais aproximados dos ácidos graxos mais abundantes nas dietas AIN-93 e comercial.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ACC</b>	Acetil-CoA carboxilase
<b>ADRP</b>	Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos ( <i>Adipose differentiation related protein</i> )
<b>AG</b>	Ácidos graxos
<b>AGPI</b>	Ácidos graxos poli-insaturados
<b>AGS</b>	Ácidos graxos saturados
<b>AIN</b>	Instituto Americano de Nutrição ( <i>American Institute of Nutrition</i> )
<b>AIN- 93 1m</b>	Grupo de animais submetidos à dieta AIN-93 por 1 mês
<b>AIN- 93 4m</b>	Grupo de animais submetidos à dieta AIN-93 por 4 meses
<b>AIN- 93G</b>	Dieta AIN-93 para a fase de crescimento
<b>AIN- 93M</b>	Dieta AIN-93 para a fase de manutenção
<b>ALP</b>	Fosfatase alcalina ( <i>Alkaline phosphatase</i> )
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase ( <i>Alanine aminotransferase</i> )
<b>AMPK</b>	Proteína quinase ativada por AMP ( <i>AMP-activated protein kinase</i> )
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase ( <i>Aspartate aminotransferase</i> )
<b>Bax</b>	Proteína x associada à Bcl-2 ( <i>Bcl-2 associated protein X</i> )
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
<b>Bim</b>	Proteína 11 associada a Bcl-2 ( <i>Bcl-2-like protein 11</i> )
<b>CB1R</b>	Receptores canabinóides tipo 1 ( <i>Type I cannabinoid receptor</i> )
<b>ChREBP</b>	Proteína ligadora do elemento de resposta aos carboidratos ( <i>Carbohydrate responsive element-binding protein</i> )
<b>CIDE</b>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor-<math>\alpha</math>-like effector</i>
<b>CIDEA</b>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor-<math>\alpha</math>-like effector-A</i>
<b>CIDEB</b>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor-<math>\alpha</math>-like effector-B</i>
<b>CIDEC</b>	<i>Cell death-inducing DNA fragmentation factor-<math>\alpha</math>-like effector-C</i>
<b>CREBH</b>	Proteína H ligadora do elemento de resposta ao AMP cíclico ( <i>AMPc-responsive element-binding H protein</i> )
<b>DCo 1m</b>	Grupo de animais submetidos à dieta comercial por 1 mês
<b>DCo 4m</b>	Grupo de animais submetidos à dieta comercial por 4 meses
<b>DFGNA</b>	Doença do fígado gorduroso não-alcoólica
<b>DHA</b>	Ácido graxo docosaexaenóico ( <i>Docosahexaenoic acid</i> )

<b>EH</b>	Esteatose hepática
<b>EHNA</b>	Esteato-hepatite não-alcoólica
<b>EPA</b>	Ácido graxo eicosapentaenóico ( <i>Eicosapentaenoic acid</i> )
<b>ERE</b>	Estresse do retículo endopasmático
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FoxO3A</b>	Fator de transcrição da família <i>forkhead</i> relacionado à expressão de Bim
<b>GEH</b>	Graus de esteatose hepática
<b>HDL-c</b>	Lipoproteína de alta densidade - colesterol ( <i>High-density lipoprotein cholesterol</i> )
<b>IKβ</b>	Inibidor de NFκB
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>JNK</b>	Protein quinase c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal ( <i>c-Jun NH(2)-terminal protein Kinases</i> )
<b>LDL-c</b>	Lipoproteína de baixa densidade - colesterol ( <i>Low-density lipoprotein cholesterol</i> )
<b>LDN</b>	Lipogênese <i>de novo</i>
<b>MTP</b>	Proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis ( <i>Microsomal triglyceride transfer protein</i> )
<b>NFκB</b>	Fator nuclear kappa B ( <i>Nuclear factor kappa B</i> )
<b>PAF</b>	Peso absoluto do fígado
<b>PPAR</b>	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos ( <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
<b>PRF</b>	Peso relativo do fígado
<b>Puma</b>	Modulador de apoptose supra regulado p53 ( <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> )
<b>RI</b>	Resistência à insulina
<b>SCD-1</b>	Estearoil-CoA dessaturase-1 ( <i>Stearoyl-CoA dessaturase-1</i> )
<b>SIRT1-7</b>	Sirtuínas de 1 a 7
<b>SREBP-1c</b>	Proteína ligadora do elemento de resposta aos esteróis -1c ( <i>Sterol regulatory element binding protein 1c</i> )
<b>TAG</b>	Triacilglicerol
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral-α ( <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> )
<b>TRAIL</b>	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral ( <i>Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> )

<b>UPR</b>	Resposta a proteínas desdobradas ( <i>Unfolded protein response</i> )
<b>VLDL-c</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade - colesterol ( <i>Very low-density lipoprotein cholesterol</i> )
<b>γ-GT</b>	Gama-glutamil transferase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LIETERATURA: ÁCIDOS GRAXOS E A DOENÇA DO FÍGADO GORDUROSO NÃO-ALCOÓLICA</b> .....	<b>18</b>
	RESUMO.....	19
<b>2.1.</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Doença do fígado gorduroso não-alcoólica: patogênese e progressão</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Ácidos graxos no contexto da doença do fígado gorduroso não-alcoólica</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>ARTIGO DE RESULTADOS: PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E SUA RELAÇÃO COM A ESTEATOSE HEPÁTICA E O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS PADRÃO</b> .....	<b>56</b>
	RESUMO.....	57
<b>3.1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	<b>61</b>
3.2.1	Animais de experimentação e tratamento dietético.....	61
3.2.2	Determinações bioquímicas séricas.....	63
3.2.3	Sacrifício, dissecação, processamento e análise histológica do fígado.....	64
3.2.4	Determinação do perfil em ácidos graxos das dietas e do tecido hepático.....	64
3.2.4.1	Extração dos lipídios totais das dietas e do tecido hepático.....	64
3.2.5	Metilação.....	65
3.2.6	Análise estatística.....	66
3.2.7	Considerações éticas.....	67
<b>3.3</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>67</b>
<b>3.4</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>73</b>
<b>3.5</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>91</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>100</b>





A doença do fígado gorduroso não-alcoólica (DFGNA) engloba um espectro de alterações que variam desde a esteatose hepática (EH), acúmulo de triacilgliceróis no citoplasma dos hepatócitos, até a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), esteatose com componente necroinflamatório, com ou sem fibrose, podendo levar à cirrose e, em última instância, ao carcinoma hepatocelular (DUNN et al., 2008; DUVNJAK et al., 2007; SHERLOCK e DOOLEY, 2002).

A EH é caracterizada como o acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, em sua maioria como triacilgliceróis, que excede em 5% o peso do fígado. Ocorre por uma falha do metabolismo lipídico hepático normal, devido a um defeito dentro do hepatócito (mecanismos intra-hepáticos) ou à oferta de AG ou carboidratos em excesso ao órgão, superando a sua capacidade de secreção de lipídios (mecanismos extra-hepáticos) (SHERLOCK e DOOLEY, 2002).

Pacientes portadores de esteatose podem ter um prognóstico benigno (SAKAGUSHI et al., 2011); contudo, esta condição apresenta elevada capacidade de progressão, podendo evoluir para a esteato-hepatite não-alcoólica, seguida por cirrose, em até 25% dos pacientes (BACON et al., 1994).

O exato mecanismo da progressão da EH para a EHNA e suas conseqüências ainda não está bem esclarecido. O chamado modelo dos “dois *hits*” da patogênese da DFGNA, proposto por Day e James, em 1998, é o mais aceito atualmente. O primeiro *hit* leva ao acúmulo de gordura no fígado, induzindo à EH, deixando o órgão vulnerável ao segundo *hit*, gerado por agressões que promovem estresse oxidativo, lesão do hepatócito, inflamação e fibrose.

O conhecimento dos fatores etiológicos que determinam a progressão e a patogênese da EH é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, diversos estudos (ARAYA et al., 2004; GENTILE e PAGLIASSOTTI, 2008; MARSMAN et al., 2011) têm investigado um possível envolvimento dos diferentes ácidos graxos (AG) na patogênese, progressão e/ou reversão da EH. Investigações recentes mostram diferenças significativas nos danos hepáticos induzidos por estes compostos (BUETTNER et al., 2006; PURI et al., 2007; TETRI et al., 2008).

Neste contexto, a dieta reveste-se de grande importância, por ser um dos principais fatores do componente ambiental que controla a composição em AG das membranas biológicas, especialmente através da modulação dos AG esterificados aos seus fosfolípidios (HULBERT et al., 2005; PAN e STORLIEN, 1993).

Em estudos com experimentação animal, modificações dietéticas podem induzir o quadro de EH; contudo, em estudos anteriormente realizados pelo presente grupo de investigação (ATAIDE et al., 2009; SILVA et al., 2008), observou-se um quadro de EH com uso de dieta padrão livre de qualquer manipulação dietética que pudesse induzi-la. Assim, as dietas para animais de laboratório, consideradas padrão, merecem atenção especial, pois ainda apresentam limitações que exigem esforços para serem superadas (KLURFELD et al., 2002; MEAD, 2006; SABBATINI et al., 2006).

Esta dissertação é composta por um capítulo de revisão e um artigo de resultados e objetivou discutir a patogênese e a progressão da DFGNA, enfocando o envolvimento de diferentes AG, e determinar o perfil em AG do fígado de ratos *Wistar* alimentados com dietas padrão, avaliar a influência das dietas sobre o perfil encontrado e investigar a relação de tal perfil com o quadro de EH observado e o perfil lipídico sérico dos animais.

O capítulo de revisão permitiu concluir que os AG saturados, especialmente o ácido palmítico, apresentam marcantes propriedades lipoapoptóticas, enquanto os AG monoinsaturados parecem ser esteatogênicos, porém, não primariamente citotóxicos. Sugere-se que os AG poliinsaturados, a exemplo do  $\alpha$ -linolênico, do eicosapentaenóico e do docosaenaenóico, por sua vez, são capazes de reverter danos hepáticos e de proteger contra a EH.

O artigo de resultados demonstrou que as dietas exerceram influência sobre o perfil em AG do tecido hepático dos animais, embora a associação direta entre o perfil em AG das dietas consumidas e o perfil do tecido hepático não tenha sido estabelecida, possivelmente por fatores endógenos relacionados ao metabolismo lipídico dos animais. O perfil em AG do tecido hepático, no entanto, guardou relação com a infiltração gordurosa observada, com possíveis repercussões sobre o prognóstico da doença, particularmente em relação aos AG palmítico, esteárico, oléico e palmitoléico, com reconhecida influência sobre a DFGNA (BUETTNER et al., 2006; LISTENBERGER et al., 2003; NISHITANI et al., 2007; WEIGERT et al., 2004).

**2 REVISÃO DE LITERATURA: ÁCIDOS GRAXOS E A DOENÇA  
DO FÍGADO GORDUROSO NÃO-ALCOÓLICA**

## RESUMO

A doença do fígado gorduroso não-alcoólica (DFGNA) engloba um espectro de danos hepáticos que variam desde a esteatose hepática (EH) até a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), esteatose com componente necroinflamatório, com ou sem fibrose, podendo levar à cirrose e, em última instância, ao carcinoma hepatocelular. A EH é caracterizada por acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, que excede em 5% o peso do fígado. Ocorre por uma falha do metabolismo lipídico hepático normal, devido a um defeito dentro do hepatócito (mecanismos intra-hepáticos) ou à oferta de ácidos graxos (AG) ou carboidratos em excesso ao órgão, superando a capacidade de secreção de lipídios da célula (mecanismos extra-hepáticos). O conhecimento dos fatores etiológicos que determinam a progressão e a patogênese da EH é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, diversos estudos têm mostrado diferenças no envolvimento dos AG na patogênese, na progressão e/ou na reversão da EH. O objetivo deste estudo foi discutir a etiologia, a progressão e/ou a reversão da EH promovidas por diferentes AG. Os AG saturados (AGS), especialmente o ácido palmítico e o esteárico, podem apresentar marcantes propriedades lipoapoptóticas e citotóxicas, enquanto os AG monoinsaturados (AGMI), especialmente o ácido oléico e o palmitoléico, parecem ser esteatogênicos, porém, citoprotetores, quando comparados aos AGS, podendo até reverter os danos por eles causados. Sugere-se que os AG poliinsaturados (AGPI), a exemplo do  $\alpha$ -linolênico, do eicosapentaenóico e do docosaexaenóico, são capazes de reverter danos hepáticos e de proteger contra a EH. Assim, a presente investigação revela abordagens potenciais para a prevenção e o tratamento da DFGNA, a exemplo da indicação de uma dieta equilibrada em AGPI e AGMI, com níveis mais baixos de AGS, de acordo com os padrões de recomendação nutricional, além do possível benefício da suplementação com AGPI da família  $\omega$ -3 e do aumento do consumo de antioxidantes, reduzindo ao máximo a ingestão de AG *trans*.

**Palavras-chave:** Esteatose hepática. Esteato-hepatite não-alcoólica. Lipídios.

## ABSTRACT

The nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses a spectrum of liver damage ranging from hepatic steatosis (HS) to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) steatosis with necro inflammatory component, with or without fibrosis, which can lead to cirrhosis and ultimately to hepatocellular carcinoma. The HS is characterized by accumulation of lipids in the cytoplasm of hepatocytes, which exceeds 5% the weight of the liver. Occurs due to failure of normal hepatic lipid metabolism due to a defect within the hepatocyte (intrahepatic mechanisms) or the supply of fatty acids (FA) or excess carbohydrates to the organ, exceeding the capacity of the cell secretion of lipids (extrahepatic mechanisms). Knowledge of etiological factors that determine the progression and pathogenesis of HS is important for the development of new therapeutic strategies. In this regard, several studies have shown differences in the involvement of FA in the pathogenesis, progression and/or reversal of HS. The objective of this study was to discuss the etiology, progression and/or reversal of HS promoted by different FA. The saturated FA (SFA), especially palmitic acid and stearic acid, may have marked lipoapoptóticas and cytotoxic properties, while monounsaturated FA (MUFA), particularly oleic acid and palmitoleic, esteatogênicos seem, however, cytoprotective, when compared to SFA, and may even reverse the damage caused by them. It is suggested that polyunsaturated FA (PUFA), such as the  $\alpha$ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are able to reverse hepatic damage and protect against HS. Thus, this research reveals potential approaches to the prevention and treatment of NAFLD, such as the indication of a balanced diet in PUFA and MUFA, with lower levels of SFA, in accordance with the standards of nutritional recommendations, besides the possible benefit of PUFA supplementation with  $\omega$ -3 family and the increased consumption of antioxidants, avoiding the intake of trans FA.

**Keywords:** Hepatic steatosis. Non-alcoholic steatohepatitis. Lipids.

## 2.1 Introdução

A doença do fígado gorduroso não-alcoólica (DFGNA) engloba um espectro de danos hepáticos que variam desde uma simples esteatose hepática (EH), acúmulo de triacilgliceróis (TAG) no citoplasma dos hepatócitos, até a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), esteatose com componente necroinflamatório, com ou sem fibrose, podendo levar à cirrose e, em última instância, ao carcinoma hepatocelular (DUNN et al., 2008; DUVNJAK et al., 2007; SHERLOCK e DOOLEY, 2002). A maioria dos portadores da DFGNA é assintomática, mas alterações laboratoriais podem ocorrer, especialmente nos níveis séricos de enzimas hepática (PADOIN et al., 2008).

Em geral, o diagnóstico da DFGNA está associado a uma sobrevida mais curta que o esperado para a população normal da mesma idade e sexo, e este aumento na mortalidade é principalmente devido a doenças cardiovasculares (BELLENTANI e MARINO, 2009).

Alguns métodos de diagnóstico da DFGNA são considerados insuficientes, como o aumento dos níveis séricos de aminotransferases e exames de imagem. Níveis normais de aminotransferases não excluem a DFGNA e os achados ao ultrassom, apesar de evidenciarem hepatomegalia e acúmulo de lipídeos no fígado, não permitem diferenciar a EH da EHNA. Desta forma, o exame de biópsia hepática é considerado o padrão-ouro para a avaliação da DFGNA (BERENSTEIN, 2007).

As verdadeiras incidência e prevalência da DFGNA não são bem conhecidas (DUVNJAK et al., 2007). É considerada a causa mais comum de doença hepática crônica em americanos (MARCHESINI et al., 2001; SCHWIMMER et al., 2006; WESTON et al., 2005) e, possivelmente, na população mundial (BELLENTANI e MARINO, 2009). Dois recentes grandes estudos de base populacional relataram que 30% dos adultos norte-americanos (BROWNING et al., 2004) e 25% dos adultos italianos (BEDOGNI et al., 2005) têm EH. Homens e mulheres são igualmente afetados (NEUSCHWANDER-TETRI e CALDWELL, 2003).

No Brasil, ainda não se dispõe de nenhum dado sobre a prevalência da DFGNA na população geral. Uma análise retrospectiva sobre a prevalência de esteatose ao ultrassom abdominal encontrou uma prevalência global de 19,2% de esteatose em usuários de um serviço de ultrassonografia, na cidade de São Paulo (PARISE et al., 2003).

A forma mais preocupante da DFGNA é a EHNA, devido ao risco de doença hepática progressiva. Esta condição é caracterizada histologicamente por esteatose, infiltrados inflamatórios e degeneração dos hepatócitos (DUNN et al., 2008), podendo apresentar diferentes graus de cicatrização e fibrose (BRUNT, 2004). O estresse oxidativo, a peroxidação lipídica e a morte celular, bem como a injúria hepática mediada pelas citocinas pró-inflamatórias podem desempenhar papel central na sua gênese (ANSTEE e GOLDIN, 2006).

O exato mecanismo da progressão da EH para EHNA e suas conseqüências ainda não está bem esclarecido. O modelo dos “dois *hits*” da patogênese da DFGNA, proposto por Day e James (1998), é o mais aceito atualmente. O primeiro *hit* é constituído pelo mecanismo que causa o acúmulo de gordura no fígado levando à EH, ou seja, a agressão inicial. O tecido hepático torna-se, então, vulnerável ao segundo *hit*, promovido por agressões mediadas por vírus, álcool e lipopolissacarídeos, os quais induzem estresse oxidativo hepático, com subsequente peroxidação lipídica e secreção de citocinas pro-inflamatórias, e por hormônios derivados do tecido adiposo (adipocitocinas), dentre outros fatores, levando à lesão do hepatócito, inflamação e fibrose (DUVNJAK et al., 2007).

Outro modelo, defendido por Wanless e Shiota (2004), é composto por quatro etapas na patogênese e evolução da EH. O primeiro passo é a esteatose mediada pela RI; o segundo é a necrose induzida pela toxicidade de lipídios intracelulares e/ou produtos da peroxidação lipídica; o terceiro passo é a liberação dos lipídios dos hepatócitos para o interstício, levando à lesão inflamatória das veias hepáticas; e, o quarto, a obstrução venosa com colapso secundário, culminando com septação fibrosa e cirrose.

O conhecimento dos fatores etiológicos que determinam a progressão e a patogênese da EH é importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste sentido, diversos estudos (ARAYA et al., 2004; GENTILE e PAGLIASSOTTI, 2008; MARSMAN et al., 2011) têm investigado um possível envolvimento dos diferentes ácidos graxos (AG) na patogênese, progressão e/ou reversão da EH. Investigações recentes mostram diferenças significativas nos danos hepáticos induzidos por tais compostos (BUETTNER et al., 2006; PURI et al., 2007; TETRI et al., 2008).

Dado o número crescente de evidências que associam os lipídios dietéticos, particularmente os AG, e a DFGNA, o objetivo deste estudo foi discutir a etiologia, progressão e/ou reversão da EH promovidas por diferentes AG, visando fornecer subsídios



para uma melhor compreensão da fisiopatologia da DFGNA, bem como da síndrome metabólica.

## **2.2 Doença do fígado gorduroso não-alcoólica: patogênese e progressão**

A EH, evento inicial da DFGNA, é caracterizada como o acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, em sua maioria como TAG, que excede em 5% o peso do fígado. Ocorre por uma falha do metabolismo lipídico hepático normal, devido a um defeito dentro do hepatócito (mecanismos intra-hepáticos) ou à oferta de AG ou carboidratos em excesso ao órgão, superando a capacidade de secreção de lipídios da célula hepática (mecanismos extra-hepáticos) (SHERLOCK e DOOLEY, 2002). Suas características histológicas são semelhantes ao da doença hepática alcoólica, no entanto, ocorre em indivíduos que não fazem consumo habitual de álcool (PADOIN et al., 2008).

Do ponto de vista prático, a EH é estimada como porcentagem de hepatócitos com gordura observada em microscopia (NEUSHWANDER-TETRI e CALDWELL, 2003). O critério histológico descrito por Burt et al. (1998) para a EH em humanos é o mais utilizado, classificando-a como leve, menor que 1/3 do parênquima hepático acometido, moderada, de 1/3 a 2/3, ou severa, maior que 2/3.

Originariamente, a EH foi considerada uma manifestação benigna (ANSTEE e GOLDIN, 2006); contudo, esta condição apresenta elevada capacidade de progressão e é capaz de desencadear um amplo espectro de manifestações clínicas e patológicas, como a EHNA, condição que pode evoluir para cirrose em até 25% dos pacientes (BACON et al, 1994). É, ainda, um forte fator de risco para o aumento da mortalidade geral (ONG; PITTS; YOUNOSSI, 2006) e por doenças hepáticas (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005), fato que a tem revelado como um importante problema de saúde pública (ANGULO, 2002).

A depender da causa, a EH pode ser classificada como primária ou secundária. Dentre as causas primárias estão aquelas não atribuíveis a um único fator etiológico e que estão associadas a componentes da síndrome metabólica, como obesidade, hipertrigliceridemia e diabetes tipo 2. Entre as secundárias, estão fatores nutricionais (nutrição parenteral total, rápida perda de peso), drogas (glicocorticóides, ácido acetilsalicílico), toxinas (toxina do *Bacillus cereus*) e distúrbios metabólicos (lipodistrofia, disbetalipoproteinemia, esteatose hepática aguda da gravidez) (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005).

O padrão de acúmulo de lipídios difere entre os pacientes, permitindo, ainda, classificar a EH em duas formas de expressão morfológicas: macrovesicular e microvesicular. Na esteatose macrovesicular, os hepatócitos são caracterizados pela presença de grandes vacúolos vazios, com núcleo deslocado para a periferia da célula, e marcada fibrose pericelular da zona 3 (espaço de Disse), muitas vezes apresentando edema de hepatócitos (SHERLOCK e DOOLEY, 2002). Já a microvesicular revela hepatócitos com acúmulo intracitoplasmático de pequenos vacúolos de lipídios (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001), núcleo central e nucléolos proeminentes, com inflamação mínima e necrose celular variável e leve, embora, ocasionalmente, pode haver grande necrose na zona 3. As duas formas podem ocorrer simultaneamente (SHERLOCK e DOOLEY, 2002) e diferem em seus mecanismos fisiopatológicos: a primeira tem como mecanismo básico o aumento na oferta de AG ao fígado e a redução na mobilização desses compostos e, a segunda, resulta de diminuição na oxidação mitocondrial de AG, gerando grave distúrbio no metabolismo oxidativo celular (GAYOTTO; VIANNA; LEITÃO, 2001).

O aumento no interesse pelos estudos relacionados à EH se deu pelos achados de associação independente entre o acúmulo de TAG no fígado e obesidade (CHAN et al., 2004; MARCEAU et al., 1999), dislipidemia (SAVAGE e SEMPLE, 2010), hipertensão (SCIACQUA et al., 2011), diabetes tipo 2 (TOLMAN et al., 2007) e, principalmente, RI (ANGELICO et al., 2005; MUSSO et al., 2008), fatores que levaram esta doença a ser considerada atualmente como o componente hepático da síndrome metabólica (DEN BOER et al., 2004; DUVNJAK et al., 2007; KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2008; SANTOS, 2008; YOUNOSSI, 2008). Outros estudos relatam, ainda, associação independente entre DFGNA e aumento do risco cardiovascular (MISRA; KHASHAB; CHALASAN, 2009) e biomarcadores de doença cardiovascular (TARGHER et al., 2008).

A patogênese da DFGNA e, em particular, os mecanismos que levam ao dano hepatocelular progressivo, não estão totalmente esclarecidos (LI et al., 2009). Acredita-se que o acúmulo de TAG hepático (primeiro “*hit*” da DFGNA) dá-se inicialmente por alterações em fatores locais e sistêmicos, que controlam a entrada ou a síntese de lipídeos no fígado e a sua oxidação ou exportação para outros tecidos. Neste sentido, a RI reveste-se de grande importância (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005). A hiperinsulinemia gerada por este fator pode promover o acúmulo de TAG a partir de fatores intra-hepáticos, como o aumento da lipogênese *de novo* (LDN), redução da oxidação de AG e diminuição da exportação de

lipídios do fígado, através da lipoproteína de muito baixa densidade (*Very low-density lipoprotein* - VLDL) (ANSTEE e GOLDIN, 2006; DEN BOER et al., 2004; SHERLOCK e DOOLEY, 2002; YOUNOSSI, 2008).

A LDN, processo caracterizado pela conversão do excesso de carboidrato em AG, é regulada de forma independente pela insulina e pela glicose (KOO; DUTCHER; TOWLE, 2001) e está aumentada em pacientes com a DFGNA (DIRAISON; MOULIN; BEYLOT, 2003). O efeito lipogênico da insulina no fígado é mediado transcricionalmente pela proteína ligadora do elemento de resposta aos esteróis-1c (*Sterol regulatory element binding protein 1c* - SREBP-1c), uma das três isoformas da família de fatores de transcrição gênica que regula a homeostase lipídica em células animais (ANSTEE e GOLDIN, 2006; SHIMOMURA; BASHMAKOV; HORTON, 1999).

Dentre as enzimas que são transcricionalmente ativadas por SREBP e que participam das vias de síntese dos AG estão a ATP-citrato liase e a acetil-CoA sintetase, enzimas produtoras de acetil-CoA, o precursor de AG, a partir do citrato e do acetato, respectivamente, e ácido graxo sintase, enzima citosólica responsável pela síntese de AG saturados (AGS) com até 16 carbonos na cadeia (16:0) (HORTON, 2002). Outros genes alvos da SREBP-1c codificam uma enzima velocidade limitante do complexo ácido graxo elongase, que converte palmitato (16:0) em estearato (18:0) (MOON et al, 2001), bem como a estearoil-CoA dessaturase (*stearoyl-CoA dessaturase* - SCD), enzima que converte estearato em oleato (18:1) (EDWARDS et al, 2000). Surpreendentemente, mesmo na presença de uma significativa RI, a insulina estimula a transcrição da SREBP-1c hepática (SHIMOMURA; BASHMAKOV; HORTON, 1999), promovendo aumento na LDN (ADAMS; ANGULO; LINDOR, 2005; SHIMANO et al., 1997), fato que pode levar ao desenvolvimento da EH.

A contínua ativação da lipogênese no fígado, mesmo na RI, é paradoxal. Dados recentes sugerem que a ativação da SREBP-1c e, portanto, da lipogênese é secundária a um estresse do retículo endoplasmático (ERE) no fígado esteatótico, independente da insulina. A inibição do ERE em roedores obesos diminui a ativação do SREBP-1c e a lipogênese, melhorando a EH e a sensibilidade à insulina (FERRÉ e FOUFELLE, 2010). O ERE tem sido observado em tecido hepático e adipócitos de humanos com a DFGNA e/ou obesidade. Tal processo ativa a via de sinalização da UPR (*unfolded protein response*, resposta a proteínas desdobradas), envolvida na biosíntese de lipídios, ação insulínica, inflamação e apoptose

(HOTAMISLIGIL, 2010; KIM; XU; REED, 2008). A ativação do ERE também está associada ao comprometimento na secreção de VLDL (KAMMOUN et al., 2009).

Outros fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento da EH é a proteína ligadora do elemento de resposta aos carboidratos (*Carbohydrate responsive element-binding protein* - ChREBP), reguladora transcricional determinante na síntese hepática de lipídios (POSTIC et al., 2007), e o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos (*Peroxisome proliferator-activated receptor* - PPAR), uma família de fatores de transcrição nuclear que regulam a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e no balanço de energia (CLARKE et al., 1999).

A deficiência de ChREBP reduz a lipogênese e a glicólise, pois tal fator ativa transcionalmente a piruvato quinase hepática, enzima-chave na regulação da glicólise, que catalisa a conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato, para entrar no ciclo de Krebs e gerar citrato, a principal fonte de acetil-CoA utilizado na síntese de AG (LIZUKA et al., 2004). Adicionalmente, a ChREBP é requerida para a ativação transcricional de enzimas-chave de vias lipogênicas, incluindo a acetil-CoA carboxilase (ACC), a ácido graxo sintase, a gliceraldeído 3-fosfato acetiltransferase e a SCD (DENTIN et al., 2006). Sua ativação se dá como uma resposta em longo prazo à ingestão excessiva de carboidratos, sem aparente requerimento de insulina (LIZUKA et al., 2004).

Os mecanismos moleculares dos eventos mediados pelos PPAR, que levam à deposição de TAG no fígado, por sua vez, não estão bem definidos (BROWNING et al., 2004). A depleção genética de PPAR- $\gamma$  em modelos animais de RI atenua o desenvolvimento de EH, independente da presença de hiperinsulinemia ou hiperglicemia (GAVRILOVA et al., 2003; MATSUSUE et al., 2003), assim como seu RNAm é supra-regulado em fígado de pacientes obesos com EH, representando um reforço para o mecanismo lipogênico induzido pelo SREBP-1c (PETTINELLI e VIDELA, 2011). Já o PPAR- $\alpha$  funciona como um sensor de lipídios no fígado, estimulando a transcrição de genes envolvidos na oxidação de AG. A administração de agonista do PPAR- $\alpha$  previne o desenvolvimento da EHNA induzida por uma dieta deficiente em colina (RAO et al., 2002); e sua ativação aumenta o *turnover* de lipídios hepáticos, sendo suficientemente poderosa para impedir o desenvolvimento de esteato-hepatite induzida por uma dieta deficiente em colina e metionina (IP et al., 2003).

A diminuição da exportação de AG pelo fígado é outro fator que pode promover o acúmulo de TAG neste órgão. Os lípidos são normalmente exportados do fígado a partir das VLDL, formadas pela proteína de transferência de triacilgliceróis microsomal (MTP), que incorporam TAG à apolipoproteína B no retículo endoplasmático e no aparelho de golgi (LETTÉRON et al., 2003). Uma redução na atividade da MTP e na síntese e secreção de apo B pode prejudicar a capacidade dos hepatócitos de exportação de lipídeos, através das VLDL, favorecendo o acúmulo de TAG no fígado (CHARLTON et al., 2002). O bloqueio da MTP é um mecanismo de indução de EH (LETTÉRON et al., 2003). A hiperinsulinemia, além de promover LDN, diminui a síntese de apolipoproteína B-100 (LEWIS et al., 1993).

O mecanismo mais relevante para o surgimento da EH é o de natureza extrahepático (DEN BOER et al., 2004). Como contribuintes para o elevação dos níveis plasmáticos de AG livres (AGL) estão o aumento na hidrólise e liberação de AG dos depósitos do tecido adiposo para a corrente sanguínea, através de maior atividade da enzima lipase hormônio sensível, e a massa aumentada de adipócitos ocasionada pela ingestão de gordura superior às necessidades energéticas, fatores estes que podem ser observados nos quadros de obesidade e, principalmente, de RI (BROWNING e HORTON, 2004; DEN BOER et al., 2004; KOTRONEN e YKI-JÄRVINEN, 2008).

Recentemente, mecanismos relacionados a falhas na formação e no estoque de lipídios têm sido investigados. Tais estudos revelam uma família de proteínas associadas às gotículas lipídicas, designadas PAT [perilipina (*perilipin*), proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (*adipose differentiation-related protein* - ADRP), *tail interacting protein of 47kDa* (*Tip47*), *S3-12* e *lipid dosage droplet protein-5* (*LSDP-5*)], que estão ativamente envolvidas na formação e no *turnover* de gotículas lipídicas, pela modulação da lipólise (BELL et al., 2008; HO et al., 2011). A composição das proteínas PAT na superfície da gotícula lipídica revela seu tamanho e número, e ajuda a manter a homeostase intracelular dos AGL, protegendo as gotículas contra a lipólise, por diminuir o recrutamento da lipase triglicérido adiposa, uma lipase específica de TAG (BELL et al., 2008). A superexpressão de perilipina e ADRP está associada a um aumento no acúmulo de TAG e à formação de gotículas lipídicas no fígado (FUKUSHIMA et al., 2005); a baixa regulação das proteínas PAT aumenta a RI e a lipólise pela lipase triglicérido adiposa (BELL et al., 2008).

Outros novos e importantes reguladores do metabolismo lipídico hepático são as proteínas pertencentes à família CIDE (*cell death-inducing DNA fragmentation factor- $\alpha$ -like*

*effector*), incluindo CIDEA, CIDEB e CIDEA (LI et al., 2007). Camundongos com mutação nula de CIDEA apresentam maior gasto energético e aprimorada lipólise no tecido adiposo marrom, e são resistentes à obesidade e ao diabetes induzidos por dieta com alto teor de gordura (ZHOU et al., 2003). Camundongos com mutação nula de CIDEB, por sua vez, são resistentes à obesidade e à EH induzidas por uma dieta rica em gordura, e apresentam maior sensibilidade à insulina, maior oxidação hepática de AG, diminuição da lipogênese e reduzida expressão de ACC, ácido graxo sintase e SCD (LI et al., 2007). Já a repressão de CIDEA pela proteína quinase ativada por mitógenos fosfatase-1 protege contra o desenvolvimento da EH (FLACH et al., 2011).

Recentes estudos revelam, ainda, uma família de proteínas desacetilases dependentes de  $\text{NAD}^+$ , constituída por sete membros, denominada sirtuínas (SIRT1-7), que regulam diversas etapas do processo biológico, incluindo o metabolismo energético. A SIRT-1, por exemplo, inibe a síntese e estimula a oxidação da gordura em resposta ao jejum, tendo como alvo o SREBP-1c (PONUGOTI et al., 2010), assim como regula a homeostase lipídica mediada pelo PPAR- $\alpha$  (PURUSHOTHAM et al., 2009). Sua transcrição é diminuída no tecido adiposo visceral de obesos mórbidos com EH severa (COSTA et al., 2010).

Canabinóides endógenos (endocanabinóides), mediadores lipídicos que fazem parte de um circuito neural complexo controlador da regulação e ingestão de energia, também têm sido implicados no desenvolvimento de fenótipos associados à EH (CHANDA et al., 2011). Suas ações são mediadas via receptores canabinóides tipo 1 (*Type I cannabinoid receptor* – CB1R), expressos em altos níveis no cérebro, mas, também, em adipócitos e hepatócitos (PACHER et al., 2006). O aumento na atividade do sistema endocanabinóide contribui para EH, RI e resistência à leptina (PACHER et al., 2008). A ativação de CB1R estimula a LDN no fígado, através da indução do SREBP-1c e as suas enzimas-alvo, ACC-1 e ácido graxo sintase (OSEI-HYIAMAN et al., 2005). Recente estudo demonstrou o mecanismo celular de regulação da gliconeogênese hepática mediada pelo sistema endocanabinóide-CB1R via indução da proteína H ligadora do elemento de resposta ao AMP cíclico (*AMPc-responsive element-binding H protein* - CREBH) (CHANDA et al., 2011), um fator de transcrição específico do fígado associado ao ERE, que exerce um importante papel na regulação hormonal da gliconeogênese hepática no jejum ou em condição de RI (LEE et al., 2010). Estudo sugere que o bloqueio seletivo de CB1R periféricos podem ser alvos para o tratamento da EH, melhora da homeostase da glicose e da dislipidemia (OSEI-HYIAMAN et al., 2008).

O primeiro insulto ao tecido hepático, com infiltração gordurosa, sensibiliza o fígado para a indução da inflamação hepática por um segundo insulto patogênico, que envolve basicamente duas grandes categorias: fatores que causam um aumento do estresse oxidativo e da subsequente peroxidação lipídica e fatores de promoção da expressão de citocinas pró-inflamatórias (principalmente TNF- $\alpha$ ) (BROWNING e HORTON, 2004; DUVNJAK et al., 2007), que contribuem diretamente para a falha de organelas, incluindo disfunção mitocondrial e ERE (TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010). Este último está associado à indução de uma resposta inflamatória sistêmica, por ativar a clivagem de CREBH (ZHANG et al., 2006).

O aumento na liberação de AGL ocasionado pelo estímulo à lipólise gerado pela RI é um fator predisponente para o estresse oxidativo (PADOIN et al., 2008), definido como um desequilíbrio entre as espécies químicas pró-oxidantes e antioxidantes, que leva à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente dano oxidativo de macromoléculas celulares (ROBERTSON; LECLERCQ; FARRELL, 2001). Tal processo tem sido frequentemente associado à EH, podendo ser uma ocorrência comum devido à lipotoxicidade gerada pelo excesso de AGL (TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010), promovendo peroxidação lipídica na membrana dos hepatócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação das células estreladas, podendo resultar em fibrose (YOUNOSSI, 2008). A disfunção mitocondrial é uma das fontes potencias para o estresse oxidativo (PESSAYRE et al., 2001).

Anormalidades mitocondriais descritas em pacientes com EHNA levam ao comprometimento da capacidade oxidativa da organela, ativando vias extra-mitocondriais de oxidação de AG nos peroxissomos ( $\beta$ -oxidação) e microssomos ( $\omega$ -oxidação), resultando em aumento da formação de EROs. A primeira via envolve ação da acil-CoA oxidase, que doa elétrons diretamente para o oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio, e, a segunda, a doação de elétrons ao oxigênio molecular, mediada pela flavoproteína. A oxidação microssomal de AG é catalisada primariamente pela enzima citocromo P450 2E1 (LIEBER, 2003), possível mediadora da peroxidação lipídica, do dano oxidativo dos principais componentes celulares e da superprodução de EROs, que podem promover RI hepática, agravando a EH (AUBERT et al., 2011). Esta enzima é super expressa em fígados de pacientes com EHNA e em modelos animais de esteato-hepatite metabólica (CHALASANI et al., 2003; SCHATTEBERG et al., 2005). Além disso, produtos da  $\omega$ -oxidação microssomal, os ácidos dicarboxílicos, possivelmente atuam como desacopladores da fosforilação oxidativa

e provocam peroxidação dos componentes da membrana mitocondrial, ocasionando diminuição da atividade da cadeia respiratória e aumento do estresse oxidativo celular (BROWNING e HORTON, 2004). Recente estudo encontrou que a disfunção mitocondrial precede o desenvolvimento da DFGNA e da RI em modelo de ratos obesos (RECTOR et al., 2010).

A peroxidação lipídica, além de ocasionar efeitos deletérios na função de organelas, forma aldeídos prejudiciais para a homeostase celular. Esses compostos prejudicam a síntese de nucleotídeos e proteínas, diminuem o antioxidante natural glutatona, aumentam a produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , promovem o influxo de células inflamatórias no fígado e ativam células estreladas, levando à deposição de colágeno, fibrose e à perpetuação do processo inflamatório (BROWNING e HORTON, 2004). Adicionalmente, os EROs podem iniciar a ativação do NF- $\kappa$ B (Fator nuclear kappa B, *Nuclear factor kappa B*), o fator de transcrição mestre de muitos mediadores inflamatórios, levando ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (CORTEZ-PINTO; MOURA; DAY, 2006). Em condições fisiológicas, o NF- $\kappa$ B permanece inativo através de sua ligação ao I $\kappa$ B (inibidor de NF- $\kappa$ B), só sendo ativado e translocado com a fosforilação e degradação do inibidor (GENTILE; FRYE; PAGLIASSOTTI, 2011), o que leva a efeitos deletérios na função hepática (DELA PENA et al., 2005).

Existem evidências de que citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF- $\kappa$ B [TNF- $\alpha$ , Interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 $\beta$ ] podem exercer um importante papel na patogênese da DFGNA, por promoverem RI sistêmica e hepática (ARKAN et al., 2005), reações similares às mediadas por EROs e peroxidação lipídica (CORTEZ-PINTO; MOURA; DAY, 2006). AGL acumulados nos hepatócitos também estimulam a expressão de tais citocinas (FELDSTEIN et al., 2004). No fígado, o TNF- $\alpha$  pode contribuir para o estresse oxidativo e a RI, através da ativação do inibidor de quinase kappa B, uma subunidade da I $\kappa$ B que, quando ativada, fosforila I $\kappa$ B, não inibindo a NF- $\kappa$ B (YUAN et al., 2001). O TNF- $\alpha$  pode, também, induzir fortemente a expressão do mRNA de CREBH (ZHANG et al., 2006) e causar uma redução na secreção da adiponectina, uma adipocitocina protetora (MAEDA et al., 2002).

Adipocitocinas são peptídios bioativos sintetizados pelo tecido adiposo visceral. Entre elas, a adiponectina e a leptina estão diretamente envolvidas em alterações metabólicas e vias inflamatórias, podendo ser particularmente importantes na patogênese da DFGNA (DUVNJAK et al., 2007). A estimulação de receptores de adiponectina no fígado leva à



ativação do PPAR- $\alpha$  e da Proteína quinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase - AMPK*) (YAMAUCHI et al., 2001; YAMAUCHI et al., 2002), uma proteína heterotrimérica que serve como um sensor de níveis de energia celular, ativada pelo aumento dos níveis de AMP, um marcador de diminuição do estoque de energia celular. A AMPK ativada estimula vias catabólicas de produção de ATP, como a  $\beta$ -oxidação, e inibe vias consumidoras de ATP, como a lipogênese, de maneira direta, fosforilando proteínas reguladoras, e indireta, afetando os níveis de expressão de genes envolvidos nessas vias (HARDIE, 2003). Desta forma, a adiponectina diminui o conteúdo hepático de TAG e a RI hepática. Apresenta, também, efeito anti-inflamatório direto, suprimindo a produção hepática de TNF- $\alpha$  (MAEDA et al., 2002; XU et al., 2003). Estudos recentes mostraram redução nos níveis séricos de adiponectina e reduzida expressão hepática de seu receptor em pacientes com EHNA, independente da RI (HUI et al., 2004; KASER et al., 2005).

A Leptina, por outro lado, tem um papel importante no desenvolvimento de RI hepática e periférica, através da inativação por desfosforilação do substrato-1 do receptor de insulina (COHEN; NOVICK; RUBINSTEIN, 1996). Dados apontam para um papel deste peptídeo na supressão aguda do metabolismo das VLDL hepáticas, por diminuição dos TAG e estimulação do metabolismo oxidativo no fígado (HUANG et al., 2009). A leptina pode, também, desempenhar um papel na fibrinogênese hepática (ANGULO et al., 2004; LECLERCQ et al., 2002).

Muito se tem investigado sobre as alterações moleculares e fisiológicas que medeiam a transição de EH para EHNA; contudo, estudos que definem claramente estas modificações ainda são limitados, por vários fatores. Inicialmente, não há modelos animais que incorporem todas as características da EH humana. Além disso, as técnicas não invasivas disponíveis para estudar o metabolismo hepático em humanos são limitadas em número e poder diagnóstico, sendo necessárias, portanto, biópsias hepáticas para diagnosticar precisamente o paciente com EHNA. Desta forma, a compreensão atual dos mecanismos pelos quais a EH evolui baseia-se quase exclusivamente em dados obtidos a partir de modelos animais (BROWNING e HORTON, 2004).

Neste sentido, vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese e progressão da EH. Tais modelos podem ser divididos em duas categorias: de mutação genética, espontânea ou induzida, e de fenótipo adquirido, produzido por qualquer manipulação dietética ou farmacológica (ANSTEE e GOLDIN,

2006). O modelo mais utilizado em estudos sobre a EH é o de deficiência genética de leptina (ob/ob) ou o de resistência à leptina (db/db). Nestes casos, os animais são resistentes à insulina e hiperinsulinêmicos, resultando em hiperglicemia e hiperlipidemia (KOTEISH e DIEHL, 2001). Entretanto, tais modelos ainda não refletem completamente o fenótipo humano da DFGNA (ANSTEE e GOLDIN, 2006).

Outros modelos, como os camundongos lipoatróficos diabéticos e os ratos ou camundongos normais alimentados com dietas deficientes em colina e metionina, também são bastante utilizados (SANTOS, 2008). Este último é um modelo bem descrito na indução da EHNA, produzindo EH pela deficiência na exportação de VLDL, provocada pela falta de fosfatidilcolina, o fosfolípido que reveste suas partículas e que depende dos precursores colina e metionina para a sua síntese (RINELLA e GREEN, 2004).

### **2.3 Ácidos graxos no contexto da Doença do fígado gorduroso não-alcoólica**

Os AG desenvolvem múltiplos papéis no organismo, são componentes constitucionais dos lipídios e fazem parte das membranas celulares, principalmente na forma de fosfolipídios (TVRZICKA et al., 2011). Estudos indicam que a regulação das funções celulares pelos lipídios pode se dar tanto pela modulação da transdução de sinal, via manipulação dos AG esterificados aos fosfolipídios de membrana, quanto pela modificação direta da transcrição de genes, onde os AG funcionam como ligantes ativadores para uma ampla gama de fatores de transcrição nuclear, tais como os PPAR (JUMP, 2008; SESSLER e NTAMBI, 1998).

Os AG dos lipídios incorporados às membranas afetam processos metabólicos, como a produção de eicosanóides e mensageiros secundários (KELLEY, 2001), a sinalização insulínica (IBRAHIM; NATARAJAN; GHAFORUNISSA, 2005), a pressão arterial (BERRY e HIRSCH, 1986) e a atividade de diversas enzimas ligadas às membranas (CLAMP et al., 1997). Um exemplo desta modulação é a liberação de AG poliinsaturados (AGPI), sob a ação da fosfolipase A2, que produz metabólitos liberados extracelularmente para agir em outras células, como o fator ativador de plaquetas e eicosanóides, bem como intracelularmente, a exemplo de diacilgliceróis e do fosfato de inositol, a partir da ação da fosfolipase C, também envolvidos na transdução de sinal (SHILS et al., 2006).

O aumento na disponibilidade de AGL também induz alterações no metabolismo celular, uma vez que esses compostos atuam como ligantes para fatores nucleares (JUMP, 2008; SESSLER e NTAMBI, 1998), afetam vias de sinalização celular (GAO et al., 2004),

induzem a síntese de citocinas inflamatórias (JOSHI-BARVE et al., 2007), a RI (LEE; CHO; KWON, 2010) e a lipoapoptose (MALHI et al., 2006).

Embora as alterações provocadas por AG possam ocorrer em quase todos os tecidos corporais, o tecido hepático é de particular importância devido a sua alta atividade metabólica e o seu papel central no metabolismo de diversos nutrientes, incluindo os próprios lipídios. Portanto, estas informações levam a crer que os diferentes AG, incorporados às membranas ou em sua forma livre, podem influenciar de forma distinta patologias específicas, notadamente aquelas associadas ao acúmulo de lipídios, a exemplo da EH.

A modulação do metabolismo celular pela composição em AG dos lipídios de membranas e o efeito lipotóxico dos AGL tornam esses elementos particularmente importantes no contexto da DFGNA. Não só o acúmulo de gordura, mas o tipo de lipídio que é depositado, em especial os seus AG constituintes, podem contribuir distintamente para o dano ao tecido hepático, o desenvolvimento da EH e sua progressão para EHNA.

A depender do grau de saturação, os AG diferem significativamente em sua contribuição para a lipotoxicidade causada pelo excesso de lipídios nos hepatócitos (BUETTNER et al., 2006; LI et al. 2009; WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006). Partindo dessa consideração, serão relatados a seguir os AG que, de alguma maneira, estão relacionados com a etiologia, a progressão e/ou a regressão da EH.

#### **a) Ácidos graxos saturados (AGS)**

Os AGS são descritos pela literatura como os mais importantes e mais potentes elicitores do efeito lipotóxico causado pelos AG nos tecidos (MAEDLER et al., 2001; WEIGERT et al., 2004). Os mecanismos celulares pelos quais esses AG são mais lipotóxicos e, especificamente lipoapoptóticos, diferentemente dos AG insaturados, não estão completamente compreendidos (SRIVASTAVA e CHAN, 2008). Contudo, este efeito tem sido atribuído à geração de espécies lipoapoptóticas específicas e de moléculas sinalizadoras (LISTENBERGER et al., 2003), cujos possíveis sítios de ação lipotóxica são o retículo endoplasmático, a mitocôndria e os lisossomos (ANDERSON e BORLAK, 2008).

Um estudo utilizando a indução de esteatose em ratos com dietas enriquecidas em sacarose (dieta alta em sacarose), banha de porco (dieta alta em AGS) ou óleo de milho (dieta alta em AGPI) verificou que, embora a magnitude da esteatose tenha sido semelhante entre os

grupos, os animais submetidos à dieta alta em AGS apresentaram aumento na concentração hepática desses AG, em comparação àqueles com dieta alta em AGPI, assim como aumento da lesão hepática e do ERE, o que levou ao aumento da atividade da caspase-3 (WANG; WEI; PAGLIASSOTTI, 2006). Li et al. (2009) também verificaram aumento da ativação das caspases e apoptose ao incubarem hepatócitos com AGS.

### ***Ácido palmítico (hexadecanoico; C16:0)***

O ácido palmítico é atualmente o mais investigado AGS no que se refere à lipotoxicidade. Diversos estudos relacionados ao tecido hepático revelam este AG como indutor de citocinas pró-inflamatórias (JOSHI-BARVE et al. 2007), da redução na síntese de antioxidantes (SRIVASTAVA e CHAN, 2008), da lipoapoptose (LI et al., 2009) e do acúmulo hepático de TAG (CAVIGLIA et al., 2011; JOSHI-BARVE et al. 2007; LI et al., 2009).

Diversos estudos revelam que este AG é menos esteatogênico do que outros, a exemplo do ácido oléico, possivelmente pela capacidade em aumentar a expressão de PPAR- $\alpha$ ; contudo, apresenta maior citotoxicidade (CAVIGLIA et al., 2011; LI et al., 2009; RICCHI et al., 2009).

No trabalho de Joshi-Barve et al. (2007), a indução, *in vitro*, de EH, através de concentrações fisiopatologicamente relevantes de ácido palmítico, revelou que este AG promoveu níveis significativamente elevados de interleucina-8, um ativador e quimioatrativo crítico de neutrófilos, basófilos e células T, em hepatócitos esteatóticos, dependentes do tempo de exposição e da concentração do AG. Os autores concluíram que este aumento em citocinas induzido por AGL pode desempenhar um papel importante em lesões hepáticas inflamatórias e no desenvolvimento da EH. Além disso, demonstrou-se que o palmitato é um indutor da diminuição da sensibilidade à insulina (LEE; CHO; KWON, 2010; RICCHI et al., 2009), da diminuição da viabilidade celular, de maneira dose-dependente (LEE; CHO; KWON, 2010; ZHANG et al., 2011a), do aumento da atividade da caspase 3 (LI et al., 2009; WEI et al., 2006; ZHANG et al., 2011a), do ERE (CAVIGLIA et al., 2011; WEI et al., 2006; ZHANG et al., 2011a) e da morte celular por apoptose (LI et al., 2009; MALHI et al., 2006; WEI et al., 2006). Recente estudo sugere que a inibição das caspases pode representar uma abordagem terapêutica válida para EHNA, já que esta família de proteases regula

predominantemente o processo de morte celular programada (apoptose), considerado um mecanismo patogênico crítico na DFGNA (ANSTEE et al., 2010).

Adicionalmente, recente investigação (SRIVASTAVA e CHAN, 2008), objetivando identificar as alterações metabólicas associadas com a lipotoxicidade dos AGS, indicou o palmitato como o responsável pela indução do fluxo diminuído da síntese do antioxidante glutathiona reduzida, em células HepG2. A lipotoxicidade foi reduzida pela suplementação com N-acetil L-cisteína, um provedor de cisteína independente do transportador de cisteína, o xTC, sugerindo que a diminuição na síntese de glutathiona reduzida ocorreu pela redução nos níveis do xTC, possivelmente provocada pelo palmitato (UNGER e ORCI, 2002). Níveis reduzidos de antioxidantes podem acelerar a progressão da EH, enquanto que uma quantidade adequada tem sido proposta para retardar a progressão e melhorar a DFGNA (ZHANG et al., 2011).

Em adição aos efeitos lipotóxicos do ácido palmítico, uma maior *síntese de novo* de ceramida (molécula mais simples do grupo dos esfingolipídios e precursora das esfingomielinas e glicosfingolipídios) foi revelada em células hepáticas expostas ao palmitato, mas não foi responsável pelo ERE e a apoptose induzida por este AG (WEI et al., 2006). As ceramidas atuam como um segundo mensageiro intracelular lipídico derivado da esfingosina, que regulam a diferenciação, a proliferação e a apoptose celular e podem ser sintetizadas através da via da hidrólise da esfingomielina ou pela síntese *de novo*, que é iniciada pela reação de condensação da serina com o palmitoil-CoA (KOLESNICK e KRÖNKE, 1998). Esta última via possui particular importância na lipoapoptose causada pelo excesso de AG (UNGER e ORCI, 2002), possivelmente por ter o palmitato como precursor (LISTENBERGER; ORY; SCHAFFER, 2001; WEI et al., 2006), o que leva à hipótese de que o acúmulo de ceramidas pode ser um dos fatores responsáveis pelo processo de apoptose provocado pelo ácido palmítico (BARREYRO et al., 2007; LISTENBERGER; ORY; SCHAFFER, 2001; WEI et al., 2006).

Os mecanismos pelos quais o AG palmítico leva à apoptose em hepatócitos, especificamente àqueles com quadro de EH, ainda não estão bem estabelecidos. Alguns dados apontam para um envolvimento do ERE na indução do processo de apoptose em células HepG2 expostas ao palmitato (LEE; CHO; KWON, 2010), possivelmente dependente de caspases (MALHI et al., 2006). Outros estudos indicam um papel da mitocôndria, como na investigação de Ji et al. (2005), onde o ácido palmítico levou a uma diminuição na regulação

do supressor apoptótico Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*), uma proteína mitocondrial, e a um marcado aumento na regulação do efetor apoptótico Bax (Proteína x associada a Bcl-2, *Bcl-2 associated protein X*), membro da família Bcl-2. A família de proteínas mitocondriais Bcl-2, também encontradas no retículo endoplasmático (HETZ et al., 2006; LISBONA et al., 2009), pode ser dividida em três categorias: anti-apoptóticas multi-domínio (Bcl-2 e Bcl-XL), pró-apoptóticas multi-domínio (Bax e Bak) e pró-apoptóticas domínio BH-3 (Bim, Bid, Bad e Puma) (GENTILE; FRYE; PAGLIASSOTTI, 2011), que, coletivamente, ajudam na função da mitocôndria como um regulador crítico precoce de apoptose, através de alterações do equilíbrio entre as pro- e as anti-apoptóticas (MICHELDES, 1999). Desta forma, os achados de Ji et al. (2005), com uma diminuição na taxa Bcl-2:Bax, ou seja, proteínas pro-apoptóticas em detrimento das anti-apoptóticas, levou os autores a sugerir que a apoptose causada pelo ácido palmítico foi mediada pela disfunção mitocondrial e que a sua citotoxicidade pode desempenhar um importante papel na progressão da EH para a EHNA. A expressão das proteínas Bcl-2 está alterada em hepatócitos na DFGNA (PANASIUK et al., 2006).

Adicionalmente, Malhi et al. (2006) também indicaram a via mitocondrial como responsável pelo processo de apoptose induzida pelo ácido palmítico, em hepatócitos com EH. A lipoapoptose encontrada pareceu ter sido desencadeada pela cascata de sinalização de JNK (Proteína quinase c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal, *c-Jun NH(2)-terminal protein Kinases*), que ativa Bax, de forma dependente de Bim (Proteína 11 associada a Bcl-2, *Bcl-2-like protein 11*), e inicia a via mitocondrial de apoptose, com a liberação do citocromo c para o citoplasma celular. Corroborando estes resultados, Barreyro et al. (2007) observaram um aumento na expressão de Bim em hepatócitos, induzido preferencialmente pelos ácidos palmítico e esteárico, de forma dependente de FoxO3A, um fator de transcrição associado à regulação da expressão de Bim.

Estas informações são extremamente relevantes no contexto da EHNA humana e sugerem que o ácido palmítico é, possivelmente, o AG mais citotóxico e lipoapoptótico. Portanto, a modulação de vias envolvidas no processo lipotóxico causado por este AG é uma potencial estratégia terapêutica para a DFGNA, mais especificamente a EHNA.

#### ***Ácido esteárico (octadecanoico; C18:0)***

Contraditoriamente ao já conhecido efeito do ácido esteárico sob o perfil lipídico sérico, que difere de outros AGS, não elevando a colesterolemia (BONANOME e GRUNDY,

1988), estudos apontam este AG como promotor de processos associados à esteatogênese e sua progressão (BARREYRO et al., 2007; NISHITANI et al., 2007).

Na investigação de Pai e Yeh (1996), uma maior taxa de síntese de mono e de diacilglicerol foi provocada com a exposição ao estearato, quando comparada a outros AGS, em cultura primária de hepatócitos de ratos. Uma maior síntese de diacilglicerol está estreitamente relacionada com a DFGNA e sua progressão, podendo contribuir para níveis alterados de TAG, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, característicos desta patologia (GORDEN et al., 2011).

Assim como ocorreu com o ácido palmítico, o tratamento de hepatócitos com o AG esteárico levou à ativação de Bax e subsequente liberação de citocromo c para o citosol (MALHI et al., 2006), bem como estimulou a atividade da proteína fosfatase 2A, ativando FoxO3A e induzindo o aumento na expressão de Bim (via PP2A/FoxO3A/Bim) (BARREYRO et al., 2007). Adicionalmente aos seus efeitos lipoapoptóticos, o tratamento em cultura de hepatócitos primários de ratos com ácido esteárico por 24 horas aumentou significativamente os níveis de interleucina-10 (NISHITANI et al., 2007) e promoveu o ERE (ZHANG et al., 2011b), consistente com o achado de que este AG foi capaz de promover uma significativa morte celular de maneira dose- e tempo-dependente (JI et al., 2005).

## **b) Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI)**

### *Ácido palmitoleico (cis-9-hexadecenoico; C16:1 $\Delta^9$ )*

Os estudos acerca das funções do ácido palmitoléico, principalmente no contexto da DFGNA, são escassos, talvez devido a sua baixa concentração nos tecidos. Investigações sobre o efeito deste AG dietético na colesterolemia revelam comportamento semelhante ao de AGS, e não ao de um AGMI (NESTEL; CLIFTON; NOAKES, 1994). Entretanto, no contexto da EH, este AG apresenta uma baixa citotoxicidade celular, quando comparado aos AGS (MALHI et al., 2006), e parece desenvolver um papel citoprotetor em relação à toxicidade mediada pelos AG (AKAZAWA et al., 2010).

Este AG, apesar de ter acentuado a EH induzida pelo ácido palmítico, no estudo de Akazawa et al. (2010), foi capaz de reduzir a lipoapoptose mediada pelos ácidos palmítico e esteárico, tanto em hepatócitos primários, quanto em linhagens de célula Huh-7 e Hep 3B, bem como de inibir o ERE, em resposta ao ácido palmítico, por diferentes vias. Por fim, o AG

palmitoléico foi capaz de reduzir a lipoapoptose das células por atenuar a expressão de Puma (Modulador de apoptose supra regulado p53, *p53 upregulated modulator of apoptosis*), proteína membro da família Bcl-2, e Bim; prevenindo, desta forma, a ativação da proteína pro-apoptótica Bax. Portanto, o AG palmitoléico, apesar de induzir EH, pode prevenir a progressão da DFGNA, por reduzir os efeitos lipotóxicos de AGS, pelo menos em parte, o que parece estar associado ao tempo de exposição a este AG.

### ***Ácido oleico (cis-9-octadecenoico; C18:1 $\Delta^9$ )***

O ácido oléico é o AGMI mais investigado e é conhecido como um importante indutor de EH, principalmente *in vitro* (RICCHI et al., 2009; ZHANG et al., 2011), mas não de citotoxicidade (LI et al., 2009; RICCHI et al., 2009). O modelo de EH induzida por este AG é utilizado em diversos protocolos experimentais (OKAMOTO; TANAKA; HAGA, 2002; ZHANG et al., 2011).

Em recentes investigações, o oleato apresentou maior capacidade de induzir o acúmulo de TAG em hepatócitos, quando comparado ao palmitato (CAVIGLIA et al., 2011; LEE et al., 2010; LI et al., 2009; RICCHI et al., 2009). No entanto, Malhi et al. (2006) observaram que este AG induziu EH de maneira similar aos ácidos palmitoléico, palmítico e esteárico, mas, foi substancialmente menos tóxico, juntamente com o ácido palmitoléico. Embora o acúmulo de TAG sensibilize o tecido hepático ao estresse oxidativo, levando à injúria hepática pela lipoperoxidação e indução de citocinas inflamatórias (BROWNING, 2004), o oleato aparentemente não leva à toxicidade celular (LI et al., 2009; MALHI et al., 2006).

A exposição a este AG induziu ERE (CAVIGLIA et al., 2011), levou a uma modesta toxicidade, à ativação das caspases 3 e 7, mesmo que em menor proporção que o ácido palmítico (MALHI et al., 2006), e aumentou significativamente os níveis de interleucina-10, em cultura de hepatócitos primários de ratos (NISHITANI et al., 2007). Adicionalmente, a indução de EH pelo ácido oléico sensibilizou hepatócitos para o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (*Tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand* - TRAIL), mas não para a citotoxicidade de TNF- $\alpha$  (MALHI et al., 2007). A TRAIL é um tipo de proteína de membrana da superfamília TNF, que induz apoptose de células tumorais e de algumas células normais específicas, a exemplo dos hepatócitos. Apesar do seu papel na saúde e na doença ainda não estar claro, esta superfamília de proteínas pode interagir com



receptores TNF e ativar a cascata de caspases e a NF- $\kappa$ B, podendo levar à apoptose celular (HILLIARD et al., 2001), um potente mecanismo de progressão da EH.

Sugere-se que a indução do acúmulo de TAG no fígado pelo AG oléico seria uma forma de evitar a lipoapoptose induzida por AGL, principalmente pelo ácido palmítico. O ácido oléico canalizaria o excesso de AGS para a síntese de TAG e armazenamento de lipídios, impedindo um aumento intracelular de metabólitos tóxicos e evitando a ativação da morte celular (LISTENBERGER et al., 2003), bem como a RI induzida por AGL (LEE; CHO; KWON, 2010).

A EH induzida pelo ácido oléico pode estar associada com a capacidade deste ácido graxo em induzir o aumento da expressão de SREBP-1c e do PPAR- $\gamma$  (RICCHI et al., 2009), bem como a diminuição da expressão de PPAR- $\alpha$  (CUI; CHEN; HU, 2010). Pode ainda, induzir a expressão de ADRP, de forma dependente de PPAR (FAN et al., 2009). Contudo, o exato mecanismo do seu efeito sobre estes fatores de transcrição não está bem esclarecido. Além disso, o acúmulo de TAG também parece ocorrer devido ao oleato ser o substrato preferencial da Acil-CoA colesterol acil-transferase e diacil-glicerol acil-transferase, enzimas responsáveis pela síntese de ésteres de colesterol e TAG, respectivamente (NTAMBI e MIYAZAKI, 2003). Consistente com estes dados, o oleato foi menos oxidado que o palmitato, em hepatócitos (SRIVASTAVA e CHAN, 2008).

Em contrapartida, apesar de a literatura registrar que uma redução na síntese e secreção de apolipoproteína B pode prejudicar a exportação de lipídeos através da VLDL, favorecendo o acúmulo de TAG no fígado (CHARLTON, 2002), o ácido oléico estimulou a secreção de lipoproteínas contendo apolipoproteína-B, pela inibição de sua degradação intracelular, no início de sua excreção (DIXON; FURUKAWA; GINSBERG, 1991). Contudo, dados sobre a relação entre um aumento na oferta de oleato ao fígado e um aumento na secreção de apolipoproteína-B ainda são controversos. Esta relação parece estar associada à dose e ao tempo de exposição a este AG, a exemplo da diminuição na capacidade de estimular a secreção de apolipoproteína-B100 pela indução do ERE, provocada por uma elevada concentração de ácido oléico durante um longo tempo de exposição, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (OTA; GAYET; GINSBERG, 2008).

Em resumo, o armazenamento de TAG intracelular no fígado, promovido pelo oleato, pode proteger a célula, pelo menos em parte, da lipotoxicidade dos AGL (ANDERSON e

BORLAK, 2008). Os efeitos negativos observados em alguns estudos podem estar relacionados às diferenças entre as doses e o tempo de exposição ao oleato, bem como ao tipo de célula utilizada para incubação, a exemplo dos resultados encontrados em células HepG2, hepatócitos primários de ratos e de humanos, quanto aos efeitos deste AG no metabolismo da apolipoproteína-B e na síntese de TAG (LIN et al., 1995).

### **c) Ácidos graxos poliinsaturados (AGPI)**

Efeitos anti-lipogênicos têm sido atribuídos aos AGPI, que podem servir como um sistema reserva para capturar radicais e agir como ligantes para fatores de transcrição nuclear. A reduzida disponibilidade intracelular desses AG pode contribuir na exacerbação da EH, aumentando o metabolismo lipídico lipogênico e a produção de moléculas inflamatórias (ANDERSON e BORLAK, 2008).

Buettner et al. (2006) encontraram desenvolvimento de EH em ratos alimentados por 12 meses com dietas ricas em óleo de coco (principalmente AGS), azeite (principalmente AGMI) e banha de porco (mistura de AGS e AGMI), enquanto os alimentados com óleo de peixe (principalmente AGPI) não apresentaram o quadro. Os motivos pelos quais os AGPI, diferentemente dos AGS e AGMI, não contribuem para o surgimento de esteatose, ainda não foram completamente elucidados. Os AGPI estão associados a uma diminuição na expressão de fatores de transcrição, como a SREBP-1c e ChREBP (DENTIN et al., 2005; YOSHIKAWA et al., 2002).

Os AGPI da família  $\omega$ -3 têm sido recentemente propostos como um tratamento potencial para a DFGNA (MASTERTON; PLEVRIS; HAYES, 2009; SHAPIRO et al., 2011), por exercerem influência negativa sobre a lipogênese (SEKIYA et al., 2003) e melhorarem as características patofisiológicas da EHNA, como a inflamação lobular e a reduzida capacidade oxidativa (MARSMAN et al., 2011). Já os AGPI da família  $\omega$ -6, bem como da  $\omega$ -3 ativam mais fortemente todas as isoformas dos receptores PPARs e são mais potentes ativadores da oxidação e supressores da síntese de AG que os AGS e os AGMI (CLARKE et al., 1999), sugerindo a promoção de um efeito protetor contra a EH. Pacientes com a DFGNA apresentaram baixos níveis hepáticos de AGPI das classes  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 (ALLARD et al., 2008; ARAYA et al., 2004), elevados peróxidos lipídicos hepáticos e baixo poder antioxidante (ALLARD et al., 2008).

***Ácido  $\alpha$ -linolênico (todo-cis-9,12,15-octadecatrienoico; C18:3 $\Delta$ <sup>9,12,15</sup>)***

Consistente com o papel benéfico dos AGPI, estudos sobre o ácido  $\alpha$ -linolênico, apesar de serem escassos na literatura, apontam para um papel na proteção contra a EH, bem como na minimização de danos causados por AGL. Este AG é capaz de reduzir o ERE induzido em hepatócitos de ratos expostos tanto ao ácido palmítico quanto ao esteárico. Desta forma, o AG  $\alpha$ -linolênico fornece proteção contra a morte celular induzida por estes AG, via redução do processo de apoptose, induzido pelo ERE (ZHANG et al., 2011a, 2011b), sugerindo um papel benéfico deste AG no processo de progressão da EH para EHNA.

***Ácido eicosapentaenoico (todo-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico; C20:5 $\Delta$ <sup>5,8,11,14,17</sup>)***

O ácido eicosapentaenóico (*Eicosapentaenoic acid* - EPA) tem sido conhecido como um agente na melhora do metabolismo lipídico e inflamação no fígado. A administração via oral de EPA foi capaz de melhorar a EH induzida por uma dieta deficiente em colina (KURIHARA et al., 1994), assim como de amenizar a EH e o carcinoma hepatocelular em camundongos que apresentavam lesões análogas às da EHNA.

O EPA pode melhorar a EH pelo aumento na expressão de PPAR- $\alpha$ , diminuição na expressão de SREBP-1c e da atividade de ChERBP. Este último é suprimido por uma alteração em sua translocação do citosol para o núcleo celular, causada tanto pelo EPA quanto pelo ácido docosaexaenóico (*Docosahexaenoic acid* - DHA) e o linoleato (DENTIN et al., 2005; ISHII et al., 2009). Adicionalmente, o EPA reduziu efetivamente a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6, em hepatócitos, citocinas envolvidas de maneira importante na progressão da EH, em condição inflamatória, induzida *in vitro*, através de lipopolisacarídeos e prostaglandina E<sub>2</sub>, quando comparado com o ácido araquidônico (HAO et al., 2010).

O EPA pode, ainda, atenuar o processo inflamatório em diferentes tecidos, através da diminuição da proliferação de linfócitos, da resposta imune mediada por células e da produção de prostaglandinas E<sub>2</sub> (PETERSON et al., 1998). Estas atividades parecem estar relacionadas com o fato de este AG ser precursor para a síntese de mediadores lipídicos derivados de AGPI de cadeia longa, os eicosanóides, que estão envolvidos na modulação da intensidade e da duração da resposta imune e inflamatória (YAQOOB, 2004).

**Ácido docosaexaenoico (todo-cis-4,7,10,13,16,19-docosaexaenoico; C22:6 $\Delta$ <sup>4,7,10,13,16,19</sup>)**

Poucos estudos relacionam o AG docosaexaenóico com a DFGNA. Contudo, uma investigação recente demonstrou que o tratamento com o DHA de crianças com a DFGNA, reduziu os níveis de TAG plasmáticos, melhorou a RI, bem como as características da EH (NOBILI et al., 2011). O DHA pode regular o acúmulo de TAG nos hepatócitos, por ser o mais potente AG regulador do SREBP-1c, diminuindo a sua atividade transcricional, e por induzir o catabolismo de AG, através da ativação dos PPARs (JUMP, 2008).

**d) Ácidos graxos *trans***

O excesso no consumo de AG *trans* é um conhecido fator de risco para doenças cardiovasculares, RI e obesidade acompanhada por inflamação sistêmica (LOPEZ-GARCIA et al., 2005; SUN et al., 2007). Entretanto, no contexto da DFGNA, a toxicidade desses AG tem sido pouco investigada.

No estudo de Tetri et al. (2008), a ingestão aumentada de AG *trans* foi associada à promoção de retenção de gordura no fígado e à injúria hepatocelular. Ao comparar o efeito da ingestão de uma dieta rica em gordura *trans* com outra rica em gordura saturada, na DFGNA, Koppe et al. (2009) verificaram aumento nos valores de alanina aminotransferase, aumento nos níveis de insulina e na RI e um marcante aumento na expressão de interleucina-1 $\beta$  em camundongos alimentados com dieta rica em gorduras *trans*, apesar de os dois grupos terem apresentado conteúdo semelhante em TAG no fígado. Já Obara et al. (2010) observaram que o consumo de AG *trans* em excesso induz EH significativa, acompanhada por um aumento da expressão hepática de genes lipogênicos, do fluxo de AGL para o fígado e do acúmulo de peróxido de lipídeos hepáticos. Portanto, os poucos estudos existentes que relacionam os AG *trans* e a DFGNA indicam que podem desempenhar um papel central nesta patologia.

## **2.4 Conclusão**

No contexto da DFGNA, foi observado que os AGS, especialmente o ácido palmítico, apresentam marcantes propriedades lipoapoptóticas, enquanto os AGMI parecem ser esteatogênicos, embora não primariamente citotóxicos. Sugere-se que os AG poliinsaturados, a exemplo do  $\alpha$ -linolênico, do eicosapentaenóico e do docosaexaenóico, por sua vez, são capazes de reverter danos hepáticos e de proteger contra a EH. Contudo, as diferenças

metodológicas entre os estudos, a exemplo das variações nas concentrações e no tempo de exposição aos AG, a dificuldade de trabalhar com as características da EH humana, os poucos estudos *in vivo* sobre o aumento na oferta de AG ao fígado, bem como a alta atividade metabólica deste órgão, dificultam a determinação de conclusões exatas sobre o papel de cada AG no contexto da DHGNA. É importante ressaltar, também, a limitação de modelos de células humanas, utilizados em grande parte dos estudos, que desconsideram a interferência da matriz e de outras células hepáticas, e de modelos animais, que ainda não refletem completamente as características da EH humana.

A presente investigação revela abordagens potenciais para a prevenção e o tratamento da DFGNA, a exemplo da indicação de uma dieta equilibrada em AGPI e AGMI, com níveis mais baixos de AGS, de acordo com os padrões de recomendação nutricional, além do possível benefício da suplementação com AGPI da família  $\omega$ -3 e do aumento do consumo de antioxidantes, reduzindo ao máximo a ingestão de AG *trans*.

## REFERÊNCIAS

1. ADAMS, L.A.; ANGULO, P.; LINDOR, K.D. Nonalcoholic fatty liver disease. **JAMC**, v. 172, n. 7, mar. 2005.
2. AKAZAWA, Y. et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced bim and PUMA upregulation and hepatocyte lipoapoptosis. **J Hepatol**, v. 52, n. 4, p. 586–593, april 2010.
3. ALLARD, J.P. et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. **J Hepatol**, v. 48, p. 300–307, 2008.
4. ANDERSON, N.; BORLAK, J. Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis. **Pharmacol Rev**, v. 60, p. 311–357, 2008.
5. ANGELICO, F. et al. Insulin Resistance, the Metabolic Syndrome, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 3, p. 1578–1582, 2005.
6. ANGULO, P. et al. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. **J Hepatol**, v. 41, p. 943–949, 2004.
7. ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **Engl J Med**, v. 346, p. 1221–1231, 2002.
8. ANSTEE, Q.M. et al. Impact of pan-caspase inhibition in animal models of established steatosis and non-alcoholic steatohepatitis. **J Hepatol**, v. 53, p. 542–550, 2010.
9. ANSTEE, Q.M.; GOLDIN, R.D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int J Exp Pathol**, v. 87, p. 1–16, 2006.
10. ARAYA, J. et. al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n–6/n–3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci**, v. 106, p. 635–643, 2004.
11. ARKAN, M.C. et al. IKK- $\beta$  links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nat med**, v. 11, n. 2, p. 191-8, feb. 2005.
12. AUBERT J. et al. Increased expression of cytochrome P450 2E1 in nonalcoholic fatty liver disease: Mechanisms and pathophysiological role. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v. 35, n. 10, p. 630-7, oct. 2011.
13. BACON, B.R. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1103-9, oct. 1994.
14. BARREYRO, F.J. et al. Transcriptional Regulation of Bim by FoxO3A Mediates Hepatocyte Lipoapoptosis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 37, p. 27141–27154, sep. 2007.
15. BEDOGNI, G. et. al. Prevalence of and Risk Factors for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Dionysos Nutrition and Liver Study. **Hepatology**, v. 42, n. 1, p. 44-52, 2005.

16. BELL, M. et al. Consequences of Lipid Droplet Coat Protein Downregulation in Liver Cells Abnormal Lipid Droplet Metabolism and Induction of Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 57, p. 2037-45, aug. 2008.
17. BELLENTANI, S.; MARINO, M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Ann Hepatol**, v. 8, n. 1, p. S4-S8, 2009.
18. BERENSTEIN, C. K. **Doença hepática gordurosa não alcoólica: avaliação histopatológica em biopsias por agulha e concordância interobservador**. Belo Horizonte, 2007. Dissertação (Mestrado), MG Faculdade de Medicina da UFMG, 2007.
19. BERRY, E.M.; HIRSCH, J. Does dietary linolenic acid influence blood pressure? **Am J Clin Nutr**, v. 44, p. 336-340, 1986.
20. BONANOME, A.; GRUNDY, S.M. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. **N Engl J Med**, v. 318, n. 19, p. 1244-8, may. 1988.
21. BROWNING, J. D. et. al. Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the United States: Impact of Ethnicity. **Hepatology**, v. 40, p. 1387–1395, dec. 2004.
22. BROWNING, J.D.; HORTON, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 147–152, 2004.
23. BRUNT, E.M. Nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, v. 24, n. 1, p. 3-20, feb. 2004.
24. BUETTNER, R. et. al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36, p. 485–501, 2006.
25. BURT, A.D.; MUTTON. A.; DAY, C.P. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. **Semin Diagn Pathol**, v. 15, n. 4, p. 246-58, nov. 1998.
26. CAVIGLIA, J.M. et al. Different fatty acids inhibit apolipoprotein B100 secretion by different pathways: Unique roles for endoplasmic reticulum stress, ceramide, and autophagy. *Journal of lipid research*. **J Lipid Res**, v. 52, n. 9, p. 1636-51, 2011.
27. CHALASANI, N. et al. Hepatic Cytochrome P450 2E1 Activity in Nondiabetic Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, p. 544-550, 2003.
28. CHAN, D.F.Y. et al. Hepatic steatosis in obese Chinese children. **Int J Obes**, v. 28, p. 1257–1263, 2004.
29. CHANDA, D. et al. Cannabinoid Receptor Type 1 (CB1R) signaling regulates hepatic gluconeogenesis via induction of ER-bound transcription factor CREBH in primary hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 286, n. 32, p. 27971-79, 2011.
30. CHARLTON, M. et al. Apolipoprotein Synthesis in Nonalcoholic Steatohepatitis. **Hepatology**, v. 35, p. 898-904, 2002.
31. CLAMP, A.G. et al. The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. **Lipids**, v. 32, n. 2, p. 179-84, 1997.

32. CLARKE, S.D. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: family lipid-activated transcription factors. **Am J Clin Nutr**, v. 70, n.4, p. 566-71, 1999.
33. COHEN, B.; NOVICK, D.; RUBINSTEIN, M. Modulation of Insulin Activities by Leptin. **Science**, v. 15, n. 274(5290), p. 1185-8, nov. 1996.
34. CORTEZ-PINTO, H.; MOURA, M.C.; DAY, C.P. Non-alcoholic steatohepatitis: From cell biology to clinical practice. **J Hepatol**, v. 44, p. 197–208, 2006.
35. COSTA, C.S. et al. SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis. **Obes Surg**, v. 20, n. 5, p. 633-9, may. 2010.
36. CUI, W.; CHEN, S.L.; HU, K. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. **Am J Transl Res**, v. 2, n. 1, p. 95-104, 2010.
37. DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, apr. 1998.
38. DELA PENA, A. et al. NF-kappaB activation, rather than TNF, mediates hepatic inflammation in a murine dietary model of steatohepatitis. **Gastroenterology**, v. 129, p. 1663–1674, 2005.
39. DEN BOER, M. et al. Hepatic Steatosis: A Mediator of the Metabolic Syndrome. Lessons From Animal Models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, p. 644-649, 2004.
40. DENTIN, R. et al. Liver-Specific Inhibition of ChREBP Improves Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in ob/ob Mice. **Diabetes**, v. 55, p. 2159-70, aug. 2006.
41. DENTIN, R. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2843-2854, oct. 2005.
42. DIRAISON, F.; MOULIN, Ph.; BEYLOT, M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. **Diabetes metab**, v. 29, p. 478-85, 2003.
43. DIXON, J.L.; FURUKAWA, S.; GINSBERG, H.N. Oleate Stimulates Secretion of Apolipoprotein B-containing Lipoproteins from Hep G2 Cells by Inhibiting Early Intracellular Degradation of Apolipoprotein B. **J Biol Chem**, v. 266, n. 8, p. 5080-5086, 1991.
44. DUNN, W. et al. Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mortality Risk in a Population-based Cohort Study. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 9, p. 2263–2271, 2008.
45. DUVNJAK, M. et. al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 34, p. 4539-4550, sep. 2007.
46. EDWARDS, P.A. et al. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. **Biochim Biophys Acta**, v. 1529, n. 1-3, p. 103-13, dec. 2000.



47. FAN, B. et al. Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 297, p. E112–E123, 2009.
48. FELDSTEIN, A.E. et al. Free Fatty Acids Promote Hepatic Lipotoxicity by Stimulating TNF- $\alpha$  Expression via a Lysosomal Pathway. **Hepatology**, v. 40, p. 185–194, 2004.
49. FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. **Diabetes Obes Metab**, 12 Suppl 2, p. 83-92, oct. 2010.
50. FLACH, R.J.R. et al. Loss of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 Protects from Hepatic Steatosis by Repression of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor A (DFFA)-like Effector C (CIDEA)/Fat-specific Protein 27. **J Biol Chem**, v. 286, p. 22195-22202, jun. 2011.
51. FUKUSHIMA, M. et al. Adipose differentiation related protein induces lipid accumulation and lipid droplet formation in hepatic stellate cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 41, n. 10, p. 321-4, nov-dec. 2005.
52. GAO, Z. et al. Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Endocrinol**, v. 18, n. 8, p. 2024-34, aug. 2004.
53. GAVRILOVA, O. et al. Liver Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Contributes to Hepatic Steatosis, Triglyceride Clearance, and Regulation of Body Fat Mass. **J Biol Chem**, v. 278, n. 36, p. 34268–34276, 2003.
54. GAYOTTO, L.C.C.; VIANNA, M.R.; LEITÃO, R.M.C. **Fígado e Drogas: Doenças do Fígado e Vias Biliares**. 1ªed. São Paulo: Atheneu; p.713-749, 2001.
55. GENTILE, C.L.; FRYE, M.; PAGLIASSOTTI, M.J. Fatty acids and the Endoplasmic Reticulum in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Biofactors**, v. 37, n. 1, p. 8-16, jan. 2011.
56. GENTILE, C.L.; PAGLIASSOTTI, M.J. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 9, p. 567–576, sep. 2008.
57. GORDEN, D.L. et al. Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic Fatty liver disease; comparison to a murine model. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22775, 2011.
58. HAO, W. et al.  $\omega$ -3 fatty acids suppress inflammatory cytokine production by macrophages and hepatocytes. **J Pediatr Surg**, v. 45, p. 2412–2418, 2010.
59. HARDIE, D.G. Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade: The Key Sensor of Cellular Energy Status. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5179–5183, dec. 2003.
60. HETZ, C. et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 $\alpha$ . **Science**, v. 312, p. 572–576, 2006.

61. HILLIARD, B. et al. Roles of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Immunol**, v. 166, p. 1314-1319, 2001.
62. HO, P.C. et al. Cytoplasmic receptor-interacting protein 140 (RIP140) interacts with perilipin to regulate lipolysis. **Cell Signal**, v. 23, n. 8, p. 1396-403, aug. 2011.
63. HORTON, J.D. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. **Biochem Soc Trans**, v. 30, part 6, p. 1091-1095, 2002.
64. HOTAMISLIGIL, G.S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. **Cell**, v. 140, p. 900-917, mar. 2010.
65. HUANG, W. et al. Leptin Augments the Acute Suppressive Effects of Insulin on Hepatic Very Low-Density Lipoprotein Production in Rats. **Endocrinology**, v. 150, p. 2169-2174, 2009.
66. HUI, J.M. et al. Beyond Insulin Resistance in NASH: TNF- $\alpha$  or Adiponectin? **Hepatology**, v. 40, p. 46-54, 2004.
67. IBRAHIM, A.; NATARAJAN, S.; GHAFLOORUNISSA. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. **Metab Clin Exp**, v. 54, p. 240-6, 2005.
68. IP, E. et al. Central Role of PPAR $\alpha$ -Dependent Hepatic Lipid Turnover in Dietary Steatohepatitis in Mice. **Hepatology**, v. 38, p. 123-132, 2003.
69. ISHII, H. et al. Eicosapentaenoic acid ameliorates steatohepatitis and hepatocellular carcinoma in hepatocyte-specific Pten-deficient mice. **J Hepatol**, v. 50, n. 3, p. 562-71, mar. 2009.
70. JI, J. et al. Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. **Exp Toxicol Pathol**, v. 56, p. 369-376, 2005
71. JOSHI-BARVE, S. et al. Palmitic Acid Induces Production of Proinflammatory Cytokine Interleukin-8 from Hepatocytes. **Hepatology**, v. 46, p. 823-830, 2007.
72. JUMP, D.B. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Curr Opin Lipidol**, v. 19, n. 3, p. 242-247, jun. 2008.
73. KAMMOUN H.L. et al. Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 12, n. 6, p. 575-82, nov. 2009.
74. KASER, S. et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. **Gut**, v. 54, p. 117-121, 2005.
75. KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**. v. 17, n 7/8, p. 669-73, 2001.
76. KIM, I.; XU, W.; REED, J.C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature Rev**, v. 7, p. 1013-30, dec. 2008.

77. KOLESNICK, R.N.; KRÖNKE, M. Regulation of Ceramide Production and Apoptosis. **Annu Rev Physiol**, v. 60, p. 643–65, 1998.
78. KOO, S.; DUTCHER, A.K.; TOWLE, H.C. Glucose and Insulin Function through Two Distinct Transcription Factors to Stimulate Expression of Lipogenic Enzyme Genes in Liver. **J Biol Chem**, v. 276, n. 12, p. 9437–9445, 2001.
79. KOPPE, S.W.P. et al. Trans fat feeding results in higher serum alanine aminotransferase and increased insulin resistance compared with a standard murine high-fat diet. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 297, p. G378–G384, 2009.
80. KOTEISH A, DIEHL AM. Animal models of steatosis. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 89-104, 2001.
81. KOTRONEN, A.; YKI-JÄRVINEN, H. Fatty Liver A Novel Component of the Metabolic Syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 27-38, 2008.
82. KURIHARA T. et al. Role of eicosapentaenoic acid in lipid metabolism in the liver, with special reference to experimental fatty liver. **Clin Ther**, v. 16, n. 5, p. 830-7, sep-oct. 1994.
83. LECLERCQ, I.A. et al. Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. **J Hepatol**, v. 37, p. 206–213, 2002.
84. LEE, J.; CHO, H.; KWON, Y.H. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. **Metabolism**, v. 59, p. 927–934, 2010.
85. LEE, M. et al. Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. **Cell Metabolism**, v. 11, p. 331–339, apr. 2010.
86. LETT'ERON, P. Et al. Inhibition of Microsomal Triglyceride Transfer Protein: Another Mechanism for Drug-Induced Steatosis in Mice. **Hepatology**, v. 38, p. 133-140, 2003.
87. LEWIS, G.F. et al. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. **Diabetes**, v. 42, n. 6, p. 833-42, jun. 1993.
88. LI, J.Z. et al. Cideb Regulates Diet-Induced Obesity, Liver Steatosis, and Insulin Sensitivity by Controlling Lipogenesis and Fatty Acid Oxidation. **Diabetes**, v. 56, p. 2523-32, oct. 2007.
89. LI, Z.Z. et al. Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease - Role of stearyl-coa desaturase. **J Biol Chem**, v. 284, n. 9, p. 5637–5644, feb. 2009.
90. LIEBER, C.S. CYP2E1: from ASH to NASH. **Hepatol Res**, v. 28, p. 1–11, 2003.
91. LIN, Y. et al. Differential effects of eicosapentaenoic acid on glycerolipid and apolipoprotein B metabolism in primary human hepatocytes compared to HepG2 cells and primary rat hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1256, n. 1, p. 88-96, apr. 1995.

92. LISBONA, F. et al. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1 $\alpha$ . **Mol Cell**, v. 33, p. 679–691, 2009.
93. LISTENBERGER, L.L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **PNAS**, v. 100, n. 6, p. 3077–3082, mar. 2003.
94. LISTENBERGER, L.L.; ORY, D.S.; SCHAFFER, J.E. Palmitate-induced Apoptosis Can Occur through a Ceramide-independent Pathway. **J Biol Chem**, v. 276, n. 18, p. 14890–14895, 2001.
95. LIZUKA K. et al. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. **PNAS**, v. 101, n. 19, p. 7281–7286, may. 2004.
96. LOPEZ-GARCIA, E. et al. Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction. **J Nutr**, v.135, p. 562–566, 2005.
97. MAEDA, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat Med**, v. 8, n. 7, p. 731-7, jul. 2002.
98. MAEDLER, K. et al. Distinct Effects of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids on  $\beta$ -Cell Turnover and Function. **Diabetes**, v. 50, p. 69–76, 2001.
99. MALHI, H. et al. Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis. **J Biol Chem**, v. 281, n. 17, p. 12093–12101, apr. 2006.
100. MALHI, H. et al. Free fatty acids sensitise hepatocytes to TRAIL mediated cytotoxicity. **Gut**, v. 56, p. 1124–1131, 2007.
101. MARCEAU, P. et al. Liver Pathology and the Metabolic Syndrome X in Severe Obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, p. 1513-1517, 1999.
102. MARCHESINI, G. et. al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease A Feature of the Metabolic Syndrome. **Diabetes**, v. 50, p. 1844–1850, ago. 2001.
103. MARSMAN, H. A. et. al. Reversal of hepatic steatosis by omega-3 fatty acids measured non-invasively by  $^1\text{H}$ -magnetic resonance spectroscopy in a rat model. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, p. 356–363, 2011.
104. MASTERTON, G.S.; PLEVRIS, J.N.; HAYES, P.C. Review article: omega-3 fatty acids – a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 31, p. 679–692, 2009.
105. MATSUSUE, K. et al. Liver-specific disruption of PPAR $\gamma$  in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. **J Clin Invest**, v. 111, n. 5, p. 737–747, 2003.
106. MICHELDES, R.J. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in antiology, prognosis and treatment of cancer. **J Clin Pathol**, v. 52, p. 555–68, 1999.

107. MISRA, V.L.; KHASHAB, M.; CHALASAN, N. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk. **Curr Gastroenterol Rep** 2009, 11:50–55
108. MOON, Y. et al. Identification of a Mammalian Long Chain Fatty Acyl Elongase Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Proteins. **J Biol Chem**, v. 276, n. 48, p. 45358–45366, 2001.
109. MUSSO, G. et al. Should Nonalcoholic Fatty Liver Disease Be Included in the Definition of Metabolic Syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects. **Diabetes Care**, v. 31, n. 3, p. 562-8, mar. 2008.
110. NESTEL, P.; CLIFTON, P.; NOAKES, M. Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men. **J Lipid Res**, v. 35, p. 656-62, 1994.
111. NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202-1219, 2003.
112. NISHITANI, Y. et al. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes. **Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi**, v. 42, n. 1, p. 32-5, feb. 2007.
113. NOBILI V. et al. Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial. **Arch Dis Child**, v. 96, n. 4, p. 350-3 apr. 2011.
114. NTAMBI, J.M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Prog Lipid Res**. v. 43, p. 91-104, 2003.
115. OBARA, N. et al. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. **J Hepatol**, v. 53, p. 326–334, 2010.
116. OKAMOTO, Y.; TANAKA, S.; HAGA Y. Enhanced GLUT2 gene expression in an oleic acid-induced in vitro fatty liver model. **Hepatol Res**, v. 23, n. 2, p. 138-144, jun. 2002.
117. ONG, J.P.; PITTS, A.; YOUNOSSI, Z.M. The impact of nonalcoholic fatty liver disease on mortality. A population-based cohort study. **Hepatology**, v. 44, Suppl. 1: 1233, 2006.
118. OSEI-HYIAMAN, D. et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1298–1305, may. 2005.
119. OSEI-HYIAMAN, D. et al. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 9, p. 3160–3169, sep. 2008.

120. OTA, T.; GAYET, C.; GINSBERG, H.N. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. **J Clin Invest**, v. 118, n. 1, p. 316-32, jan. 2008.
121. PACHER, P. et al. Modulation of the Endocannabinoid System in Cardiovascular Disease Therapeutic Potential and Limitations. **Hypertension**, v. 52, p. 601-607, 2008.
122. PACHER, P.; BÁT KAI, S.; KUNOS, G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 389-462, 2006.
123. PADOIN, A.V. et al. Doença hepática não-alcoólica gordurosa e risco de cirrose. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 18, n. 4, p. 172-176, out./dez. 2008.
124. PAI, T.K.; YEH, Y.Y. Stearic Acid Unlike Shorter-Chain Saturated Fatty Acids Is Poorly Utilized for Triacylglycerol Synthesis and  $\beta$ -Oxidation in Cultured Rat Hepatocytes. **Lipids**, v. 31, n. 2, p. 159-164, feb. 1996.
125. PANASIUK, A. et al. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 12, p. 6198-6202, 2006.
126. PARISE, E. R. et al. Prevalência de esteatose hepática em ultra-sonografia de abdome. **Gastroenterol endosc dig**, v. 22, n. 6, p. 235-237, nov.-dez. 2003.
127. PESSAYRE, D. et al. Mitochondria in steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, v. 21, n. 1, p. 57-69, 2001.
128. PETERSON, L.D. et al. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. **Lipids**, v. 22, p. 171-180, 1998.
129. PETTINELLI, P.; VIDELA, L.A. Up-regulation of PPAR-gamma mRNA expression in the liver of obese patients: an additional reinforcing lipogenic mechanism to SREBP-1c induction. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 5, p. 1424-30, may. 2011.
130. PONUGOTI, B. et al. SIRT1 Deacetylates and Inhibits SREBP-1C Activity in Regulation of Hepatic Lipid Metabolism. **J Biol Chem**, v. 285, p. 33959-33970, oct. 2010.
131. POSTIC, C. et al. ChREBP, a Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 179-192, aug. 2007.
132. PURI, P. et al. A Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 46, p. 1081-1090, out. 2007.
133. PURUSHOTHAM, A. et al. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. **Cell Metabolism**, v. 9, p. 327-338, apr. 2009.
134. RAO, M.S. et al. Prevention/reversal of choline deficiency-induced steatohepatitis by a peroxisome proliferator activated receptor a ligand in rats. **In Vivo**, v. 16, p. 145-152, 2002.

135. RECTOR, R.S. et al. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of nonalcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. **J Hepatol**, v. 52, n. 5, p. 727–736, may. 2010.
136. RICCHI, M. et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, p. 830–840, 2009.
137. RINELLA, M.E.; GREEN, R.M. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. **J Hepatol**, v. 40, n. 1, p. 47-51, jan. 2004.
138. ROBERTSON, G.; LECLERCQ, I.; FARRELL, G.C. Nonalcoholic Steatosis and Steatohepatitis II. Cytochrome *P*-450 enzymes and oxidative stress. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, p. G1135-G1139, 2001.
139. SAKAGUCHI, S. et. al. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. **Drug metab Pharmacokinet**, v. 26, n. 1, p. 30-46, 2011.
140. SANTOS, J.C.F. **Esteatose Hepática: relação com a síndrome metabólica e efeito indutor de dietas padrão utilizadas em experimentação animal**. Dissertação 2008. Universidade Federal de Alagoas, Faculdade de Nutrição. Alagoas.
141. SAVAGE, D.B.; SEMPLE, R.K. Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. **Curr Opin Lipidol**, v. 21, n. 4, p. 329-36, aug. 2010.
142. SCHATTENBERG, J.M. Hepatocyte CYP2E1 Overexpression and Steatohepatitis Lead to Impaired Hepatic Insulin Signaling. **J Biol Chem**, v. 280, n. 11, p. 9887–9894, 2005.
143. SCHWIMMER, J. B. et. al. Prevalence of Fatty Liver in Children and Adolescents. **Pediatrics**, v. 118, n. 4, p. 1388-1393, oct. 2006.
144. SCIACQUA, A. et al. Endothelial dysfunction and non-alcoholic liver steatosis in hypertensive patients. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 21, n. 7, p. 485-91, jul. 2011.
145. SEKIYA, M. et al. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. **Hepatology**, v. 38, p. 1529–1539, 2003.
146. SESSLER, A.M.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **J Nutr**, v. 128, p. 923-926, 1998.
147. SHAPIRO, H. et al. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Nutr**, v. 30, p. 6-19, 2011.
148. SHERLOCK S.; DOOLEY J. Diseases of the Liver and Biliary System. Cap. 25: **Nutritional and Metabolic Liver Diseases**, pag 423-31, 11ª edição, 2002. Blackwell Science

149. SHILS, M.E. et al. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 10th edition. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
150. SHIMANO, H. et al. Isoform 1c of Sterol Regulatory Element Binding Protein Is Less Active Than Isoform 1a in Livers of Transgenic Mice and in Cultured Cells. **J Clin Invest**, v. 99, n. 5, p. 846–854, mar. 1997.
151. SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J.D. Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus. **J Biol Chem**, v. 274, n. 42, p. 30028–30032, 1999.
152. SRIVASTAVA, S.; CHAN, C. Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line. **Biotechnol Bioeng**, v. 99, n. 2, p. 399-410, feb. 2008.
153. SUN, Q. et al. A prospective study of trans fatty acids in erythrocytes and risk of coronary heart disease. **Circulation**, v. 115, p. 1858–1865, 2007.
154. TARGHER, G. et al. NASH Predicts Plasma Inflammatory Biomarkers Independently of Visceral Fat in Men. **Obesity**, v. 16, p. 1394–1399, 2008.
155. TETRI, L. H. et. al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, p. G987–G995, sep. 2008.
156. TINIAKOS, D.G.; VOS, M.B.; BRUNT, E.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. **Annu Rev Pathol Mech Dis**, v. 5, p.145–71, 2010.
157. TOLMAN, K.G. et al. Spectrum of Liver Disease in Type 2 Diabetes and Management of Patients With Diabetes and Liver Disease. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, mar. 2007.
158. TVRZICKA, E. et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – A review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed pap med fac univ palacky olomouc czech repub**, v. 155, n. 2, p. 117–130, jun. 2011.
159. UNGER, R.H.; ORCI, L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1585, n. 2-3, p. 202-12, dec. 2002.
160. WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M.J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. **Endocrinology**, v. 147, p. 943-951, 2006.
161. WANLESS, I. R.; SHIOTA, K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. **Semin Liver Dis**, v. 24, n. 1, p. 99-106, feb. 2004.
162. WEI, Y. et al. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, p. E275-E281, 2006.



163. WEIGERT, C. et al. Palmitate, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induces the Expression of Interleukin-6 in Human Myotubes through Proteasome-dependent Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 23942–23952, 2004.
164. WESTON, S.R. et al. Racial and Ethnic Distribution of Nonalcoholic Fatty Liver in Persons With Newly Diagnosed Chronic Liver Disease. **Hepatology**, v. 41, n. 2, p. 372-379, 2005.
165. XU, A. et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. **J Clin Invest**, v. 112, p. 91–100, 2003.
166. YAMAUCHI, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1288-95, nov. 2002.
167. YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 941-6, aug. 2001.
168. YAQOOB, P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. **Proc Nutr Soc**, v. 63, p. 89–104, 2004.
169. YOSHIKAWA, T. et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. **J Biol Chem**, v. 277, p. 1705–1711, 2002.
170. YOUNOSSI, Z.M. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 28, p. 2–12, 2008.
171. YUAN, M. et al. Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of *Ikk $\beta$* . **Science**, v. 293, p. 1673-7, aug. 2001.
172. ZHANG, D. et al. Comparative study on antioxidant capacity of flavonoids and their inhibitory effects on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 4548-4558, 2011.
173. ZHANG, K. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Activates Cleavage of CREBH to Induce a Systemic Inflammatory Response. **Cell**, v. 124, p. 587–599, feb. 2006.
174. ZHANG, Y. et al. Effect of  $\alpha$ -linolenic acid on endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of palmitic acid lipotoxicity in primary rat hepatocytes. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 1-6, jul. 2011a.
175. ZHANG, Y. et al.  $\alpha$ -Linolenic acid prevents endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of stearic acid lipotoxicity on primary rat hepatocytes. **Lipids Health Dis**, v. 10, may. 2011b.
176. ZHOU, Z. et al. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. **Nat Genet**, v. 35, n. 1, p. 49-56, aug. 2003.

**3 ARTIGO DE RESULTADOS:**

**PERFIL EM ÁCIDOS GRAXOS DO FÍGADO E SUA RELAÇÃO COM A  
ESTEATOSE HEPÁTICA E O PERFIL LIPÍDICO SÉRICO DE RATOS  
SUBMETIDOS A DIFERENTES DIETAS PADRÃO**

## RESUMO

**Introdução:** Apesar da denominação, as dietas padrão atualmente utilizadas ainda estão associadas a distúrbios da saúde do animal de experimentação, a exemplo da esteatose hepática (EH). Neste contexto, a dieta pode exercer uma importante influência, pois é um dos principais fatores ambientais que controla a composição de ácidos graxos (AG) das membranas biológicas. A observação de um quadro de EH com uso de dieta padrão livre de qualquer manipulação dietética que pudesse induzi-la motivou a realização da presente pesquisa. **Objetivo:** Determinar o perfil em AG do tecido hepático de ratos, esteatóticos ou não, alimentados com dietas padrão, avaliar a influência destas dietas sobre o perfil encontrado e investigar se tal perfil guardou relação com a infiltração gordurosa e com os lipídios séricos dos animais. **Metodologia:** Quarenta ratos *Wistar* machos, desmamados aos 21 dias, foram agrupados, conforme o tipo e tempo de exposição às dietas, em: AIN-93 por 1 mês (AIN-93 1m) e por 4 meses (AIN-93 4m) e ração comercial por 1 mês (DCo 1m) e por 4 meses (DCo 4m). Foi coletado sangue para análise bioquímica e, após o sacrifício dos animais, foi retirado o fígado para histologia e posterior extração por solventes dos AG, que foram metilados com BF<sub>3</sub>/metanol. A análise dos ésteres metílicos dos AG foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Resultados:** EH foi encontrada em 90% e 100% dos animais dos grupos AIN-93 1m e AIN-93 4m, respectivamente, em 20% dos animais do grupo DCo 4m e nenhum caso no grupo DCo 1m. Os animais do grupo AIN-93 1m e 4m apresentaram 75% e 25% de casos graves, respectivamente, contra nenhum caso grave nos animais submetidos à dieta comercial. O perfil lipídico sérico e os marcadores séricos de função e lesão hepática (proteínas totais, ALT, AST, AST/ALT, ALP e  $\gamma$ -GT), diferentes da glicemia, não pareceram guardar relação com a EH. A análise do peso absoluto e do peso relativo do fígado evidenciou a importância da EH para o aumento do órgão dos animais. Os ácidos heptadecanóico e araquidônico pareceram guardar relação com a exposição às diferentes dietas. Os níveis de ácido oléico foram mais elevados e os de esteárico, mais baixos, nos grupos expostos à dieta AIN-93, independente do tempo de exposição. Não foi observada diferença para os outros AG entre os grupos. Observaram-se correlações entre os AG palmítico, esteárico, oléico e palmitoléico com o grau de EH; entre os AG esteárico e oléico com ALT e peso absoluto do fígado; entre os AG oléico e palmítico com AST; e, entre o AG esteárico e  $\gamma$ -GT. **Conclusão:** As diferentes dietas exerceram influência sobre o perfil em AG do tecido hepático dos animais, embora o intenso metabolismo lipídico hepático, provavelmente, tenha dificultado a associação direta entre o perfil das dietas e o do órgão. O tempo de exposição às dietas não pareceu influenciar o perfil em AG do tecido hepático dos animais, exceto em relação ao ácido esteárico, particularmente no grupo exposto à dieta comercial. Os AG palmítico, esteárico, oléico e palmitoléico pareceram guardar relação com a infiltração gordurosa encontrada nos animais.

**Palavras-chave:** Doença do fígado gorduroso não-alcoólica. AIN-93. Dieta comercial.

## ABSTRACT

**Introduction:** Despite the designation, the standard currently used diets are also associated with disturbances of the health of the animal experimentation, such as hepatic steatosis (HS). In this context, the diet may have an important influence, because it is one of the main environmental factors controlling the composition of fatty acids (FA) of biological membranes. The observation of a framework of HS with use of standard diet free of any dietary manipulation that could induce it motivated the development of this research. **Objective:** Determine the profile of FA rat hepatic tissue, steatotic or not, fed with standard diets, to evaluate the influence of diet on the profile found and investigate if this profile is related to the fatty infiltration and serum lipids of animals. **Methodology:** 40 male Wistar rats newly weaned were grouped according to type and duration of exposure to the diets at: AIN-93 for 1 month (AIN-93 1m) and for 4 months (AIN-93 4m) and commercial diet for 1 month (DCo 1m) and for 4 months (DCo 4m). Blood was collected for biochemical analysis and, after the sacrifice of the animals, the liver was removed for histology and subsequent solvent extraction of fatty acids, which were methylated with BF<sub>3</sub>/methanol. The analysis of methyl esters of fatty acids was performed by gas chromatography-mass spectrometry. **Results:** HS was found in 90% and 100% of animals in groups AIN-93 1m and AIN-93 4m, respectively, in 20% of group DCO 4m and none in group DCO 1m. The animals of group AIN-93 1m and 4m had 75% and 25% of serious cases, respectively, against any serious cases of animals subjected to commercial diet. The lipid profile and serum markers of hepatic function and injury (total protein, ALT, AST, AST / ALT, ALP and  $\gamma$ -GT), different blood glucose, did not appear to be related to HS. Analysis of the absolute weight and relative liver, in turn, showed the importance of the HS to growth the organ of the animals. The FA heptadecanoic and arachidonic seem to be related to exposure to different diets. The levels of oleic acid were higher and of stearic lower in the groups exposed to the diet AIN-93, independent of the exposure time. No difference was observed for the other FA. Correlations were observed between AG palmitic, stearic, oleic and palmitoleic with the degree of HS; between FA stearic and oleic with ALT and absolute weight of the liver; between the FA oleic and palmitic with AST, and between stearic acids and  $\gamma$ -GT. **Conclusions:** The different diets influence on the profile of the FA in hepatic tissue of animals, although the intense hepatic lipid metabolism probably has hampered the direct association between the profile of the diet and the liver. The time of exposure to the diets did not appear to influence the profile of the FA in hepatic tissue of animals, except for the stearic acid, particularly in the group exposed to the commercial diet. Fatty acids palmitic, stearic, oleic and palmitoleic seemed to be related to fatty infiltration found in animals.

**Key-Words:** Non-alcoholic fatty liver disease. AIN-93. Chow.

### 3.1 Introdução

A utilização de animais de laboratório em pesquisas experimentais é particularmente vantajosa pelo fato de permitir facilmente o controle de uma série de variáveis ambientais que, em seres humanos, quando possível, apresenta elevado grau de dificuldade. Dentre os fatores ambientais, a dieta reveste-se de grande importância, pois influencia o crescimento, a reprodução e o surgimento de doenças associadas ao envelhecimento, em roedores (RAO; MORRIS; SEELY, 2001). Apesar de a literatura registrar relatos de alterações detectadas em decorrência da ingestão de dietas administradas a roedores, costuma-se considerá-las resultado de falhas experimentais e não de efeitos da dieta propriamente dita, fato que subestima as suas implicações (BARBOSA, 2008).

As dietas para animais de laboratório são classificadas em três categorias. A primeira inclui as dietas não refinadas ou não purificadas, à base de cereais, frequentemente denominadas comerciais, cujos ingredientes primários são fornecidos por alimentos *in natura*, em fórmulas abertas ou fechadas. A segunda categoria é composta por dietas purificadas, elaboradas com ingredientes refinados, incluindo açúcares, óleos e isolado protéico, vitaminas e minerais. Por fim, tem-se as dietas quimicamente definidas, compostas por fontes puras de aminoácidos, mono ou dissacarídeos e ácidos graxos (AG) purificados ou triacilgliceróis (TAG), minerais e vitaminas, fornecidos por misturas de mais alta pureza (REEVES, 1997).

Os resultados de investigações, até mesmo daquelas submetidas a severos procedimentos de controle de variáveis, podem ser influenciados pelos ingredientes, pela composição nutricional, bem como pela presença de contaminantes químicos ou biológicos nas rações oferecidas aos animais de experimentação (WANG et al., 2007). Assim, as dietas consideradas padrão, como as comerciais e purificadas, merecem atenção especial, pois podem apresentar limitações não consideradas pelos investigadores, em virtude de sua finalidade, que exigem esforços para serem superadas (KLURFELD et al., 2002; MEAD, 2006; SABBATINI et al., 2006).

O Instituto Americano de Nutrição (*American Institute of Nutrition* - AIN), no período entre 1977 e 1980, com o objetivo de formular dietas padrão para experimentação animal, publicou a AIN-76, uma fórmula de dieta purificada para roedores e, posteriormente, a AIN-76A (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), uma modificação da primeira, utilizada durante anos na sua formulação original ou com modificações previstas em protocolos experimentais.

No entanto, foram descobertos vários problemas com o seu uso, como hiperlipidemia e lesões hepáticas, especialmente esteatose hepática (EH) (MEDINSKY et al., 1982; REEVES, 1997).

Diante disso, reconhecendo a necessidade de revisão das dietas propostas para roedores de laboratório, uma comissão de pesquisadores do AIN elaborou um guia para formulação de dietas padrão, prevendo o atendimento de todos os requisitos nutricionais estabelecidos para este grupo de animais, sem os efeitos colaterais anteriormente observados (McDONALD, 1997). Como resultado, foram propostas as dietas padrão AIN-93G e AIN-93M, a primeira utilizada na fase de crescimento (G, *growth*) e, a segunda, para a manutenção dos animais (M, *maintenance*), na fase adulta. No entanto, ainda há relatos de problemas relacionados ao consumo destas dietas padrão, a exemplo do quadro de EH (ATAIDE et al., 2009; SILVA et al., 2008).

A EH faz parte do conjunto de alterações que caracterizam a doença do fígado gorduroso não-alcoólica (DFGNA), termo clínico-patológico que abrange a esteatose e a esteato-hepatite não-alcoólica (EHNA), com ou sem fibrose, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (TINIAKOS; VOS; BRUNT, 2010). É caracterizada como o acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, em sua maioria como TAG, que excede em 5% o peso do fígado (SHERLOCK e DOOLEY, 2002), ou como uma dada porcentagem de hepatócitos carregados de gordura observada por microscopia ótica (NEUSHWANDER-TETRI e CALDWELL, 2003).

Mudanças no perfil em AG do tecido hepático possivelmente contribuem para o aparecimento e/ou a progressão da EH e da EHNA (ALLARD et al., 2008), pois podem influenciar o metabolismo lipídico e processos inflamatórios (ARAYA et al., 2004). Neste contexto, Araya et al. (2004) e Allard et al. (2008) observaram níveis hepáticos mais baixos de AG poliinsaturados (AGPI), especialmente os da família  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, com aumento na taxa  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 em pacientes com EH e EHNA.

Apesar de a composição em AG esterificados aos fosfolipídios de membrana ser predominantemente determinada pela genética e rigidamente controlada dentro da célula contra influências externas, a dieta é um dos principais fatores do componente ambiental que pode influenciá-la, exercendo, assim, uma importante modulação sobre a função celular de órgãos como o fígado e o tecido adiposo (GERMAN, 2011; PAN e STORLIEN, 1993).

Estudos mostram que variações no perfil lipídico da dieta e, conseqüentemente, na composição dos tecidos orgânicos, podem afetar diversos processos metabólicos, como a sinalização insulínica (IBRAHIM; NATARAJAN; GHAFOORUNISSA, 2005) a produção de eicosanóides e mensageiros secundários (KELLEY, 2001), a pressão arterial (BERRY e HIRSCH, 1986) e a atividade de diversas enzimas ligadas às membranas (CLAMP et al., 1997). Essas e outras informações disponíveis levam a crer que modificações importantes no perfil em AG de um órgão especialmente ativo, como o fígado, possam acarretar alterações metabólicas diversas.

Há modelos experimentais de indução de EH, através de modificações dietéticas, como a dieta deficiente em colina e metionina, dieta rica em AG oléico e palmítico e dieta rica em gordura (BUETTNER et al., 2006; LEE et al., 2011; RICCHI et al., 2009). No entanto, em estudos anteriormente realizados pelo presente grupo de investigação, observou-se um quadro de EH com uso de dieta padrão livre de qualquer manipulação dietética que pudesse induzi-la (ATAIDE et al., 2009; SILVA et al., 2008). Esses achados, bem como a importância de investigar a modulação dietética do perfil em AG do tecido hepático, particularmente no contexto da EH, motivaram a realização da presente pesquisa, que objetivou determinar o perfil em AG do tecido hepático de ratos, esteatóticos ou não, alimentados com dietas padrão, avaliar a influência destas dietas sobre o perfil encontrado e investigar se tal perfil guardou relação com a infiltração gordurosa e com o lipídios séricos dos animais.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Animais de experimentação e tratamento dietético

Quarenta ratos machos *Wistar*, desmamados aos 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFAL, foram divididos em quatro grupos ( $n=10$ ), nomeados segundo o tipo e o tempo de exposição às dietas, em: **AIN-93 1m** (dieta AIN-93 durante 1 mês), **AIN-93 4m** (dieta AIN-93 durante 4 meses), **DCo 1m** (dieta comercial durante 1 mês) e **DCo 4m** (dieta comercial durante 4 meses). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição, com condições controladas de temperatura ambiente (20 - 24°C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), recebendo água e dieta *ad libitum*. Nos primeiros 30 dias, foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais; após este período, os animais dos grupos AIN-93 4m e DCo 4m foram distribuídos em gaiolas de polietileno, em número de

quatro animais por gaiola, de acordo com o grupo, até o quarto mês de estudo. A ingestão dietética e o peso dos animais foram registrados semanalmente. Do desmame até o final do segundo mês de vida, os animais dos grupos AIN-93 receberam a dieta AIN-93G; a partir do terceiro mês até o sacrifício, receberam a dieta AIN-93M.

A dieta foi elaborada acrescentando-se água destilada à mistura dos ingredientes para formar uma massa homogênea que, em seguida, foi cortada e seca em estufa de circulação de ar a 60°C, por 24 horas, tendo sido oferecida sob a forma de *pellets*, após um período máximo de 15 dias de armazenamento sob refrigeração. Os ingredientes utilizados para a elaboração das dietas AIN-93 (Quadro 1) foram adquiridos da Rhoster (São Paulo, Brasil), com exceção do óleo de soja e do amido de milho, obtidos no comércio local. A dieta comercial foi adquirida da Nuvital Nutrientes SA (Paraná, Brasil) (Quadro 2).

**Quadro 1 – Composição da dieta AIN-93 nas versões G e M<sup>1</sup>**

COMPOSIÇÃO	G	M
Total de energia (Kcal/kg) <sup>▲</sup>	3.828	3.719
Proteína (%) <sup>•</sup>	17,8	12,8
Carboidratos (%) <sup>•</sup>	65,8	77,5
Lipídios (%) <sup>•</sup>	16,4	9,7
Caseína (>85% proteína; g/kg)	200	140
Amido de milho (g/kg)	497,50	565,70
Amido dextrinizado (90-94% tetrassacarídeos; g/kg)	132	155
Óleo de soja (g/kg)	70	40
Celulose microcristalina (g/kg)	50	50
Mistura mineral AIN-93 G (g/kg)	35	-
Mistura mineral AIN-93 M (g/kg)	-	35
Mistura vitamínica (g/kg)	10	10
L-cistina (g/kg)	3	1,8
L-metionina (g/kg)	1,6	-
Bitartrato de colina (41,1% colina; g/kg)	2,5	2,5
<i>t</i> -butilidroquinona (g/kg)	0,014	0,008

<sup>1</sup>Conforme Reeves (1997).

<sup>▲</sup>Estimado conforme Atwater e Bryant (1900).

<sup>•</sup>Percentual do total de energia.

Fonte: Autora, 2012.



**Quadro 2 – Composição da dieta comercial**

<b>COMPOSIÇÃO</b>	
Total de energia (Kcal/kg) <sup>▲</sup>	3000
Proteína (%) <sup>•</sup>	29,3
Carboidratos (%) <sup>•</sup>	57,2
Lipídios (%) <sup>•</sup>	13,5
Umidade (máx)	12,5%
Proteína Bruta (min)	22,0%
Extrato Etéreo (min)	4,5%
Matéria Mineral (máx)	10,0%
Matéria Fibrosa (máx)	8,0%
Cálcio (máx)	1,4%
Fósforo (min)	0,8%
Lisina	100,0mg
Metionina	300,0mg
Antioxidante	100,0mg

<sup>▲</sup>Estimado conforme Atwater e Bryant (1900)

<sup>•</sup>Percentual do total de energia

Fonte: Autora, 2012.

### 3.2.2 Determinações bioquímicas séricas

Ao final do período de exposição às dietas, os animais foram mantidos em jejum noturno, anestesiados por inalação de éter etílico e submetidos à coleta de sangue do plexo vascular retro-orbital, com auxílio de tubo capilar para micro-hematócrito. Após a retração do coágulo, o sangue foi centrifugado, a 3.500 x g, por 10 minutos, e o soro obtido foi processado em um laboratório de análises clínicas, na cidade de Maceió-AL. Foram determinadas as concentrações séricas de glicose, TAG, colesterol total, Lipoproteína de baixa densidade - colesterol (*Low-density lipoprotein cholesterol* - LDL-c) Lipoproteína de alta densidade – colesterol, (*High-density lipoprotein cholesterol* - HDL-c), Lipoproteína de muito baixa densidade - colesterol (*Very low-density lipoprotein cholesterol* - VLDL-c), proteína total, alanina aminotransferase (*Alanine aminotransferase* - ALT), aspartato aminotransferase (*Aspartate aminotransferase* - AST), fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatase* - ALP) e gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT). As determinações de VLDL-c e de LDL-c foram estimadas pelas fórmulas de Friedewald et al. (1972), desde que colesterol total <100mg/dL (SANCHEZ-MUNIZ e BASTIDA, 2008):

$$VLDL-c = \text{triacilgliceróis} \div 5$$

$$LDL-c = \text{colesterol total} - \text{colesterol HDL-c} - VLDL-c$$

### 3.2.3 Sacrifício, dissecação, processamento e análise histológica do fígado

Após a coleta de sangue, os animais, ainda anestesiados, foram submetidos à abertura completa da cavidade abdominal e sacrificados por secção da aorta torácica. Procedeu-se à retirada do fígado, o qual foi pesado para a obtenção do peso absoluto (PAF) e do peso relativo (PRF) do órgão, determinado pela relação entre o PAF e o peso corporal final do animal. O lobo maior, o esquerdo, foi seccionado no maior diâmetro e o fragmento resultante foi imerso em solução de formol a 10%, para fixação. A porção remanescente do fígado foi pesada, congelada em nitrogênio líquido e mantida em *freezer* a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para análises posteriores.

Depois de fixado, o fragmento do fígado foi clivado transversalmente e levado ao Setor de Patologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, para o processamento, inclusão em parafina e coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE) de rotina. Alterações macroscópicas, quando presentes, foram igualmente consideradas para a análise histológica. Para fins de estadiamento, a EH foi classificada em cinco graus, 0, 1, 2, 3, 4 e 5, de acordo com as características histológicas apresentadas na Figura 1.

### 3.2.4 Determinação do perfil em ácidos graxos das dietas e do tecido hepático

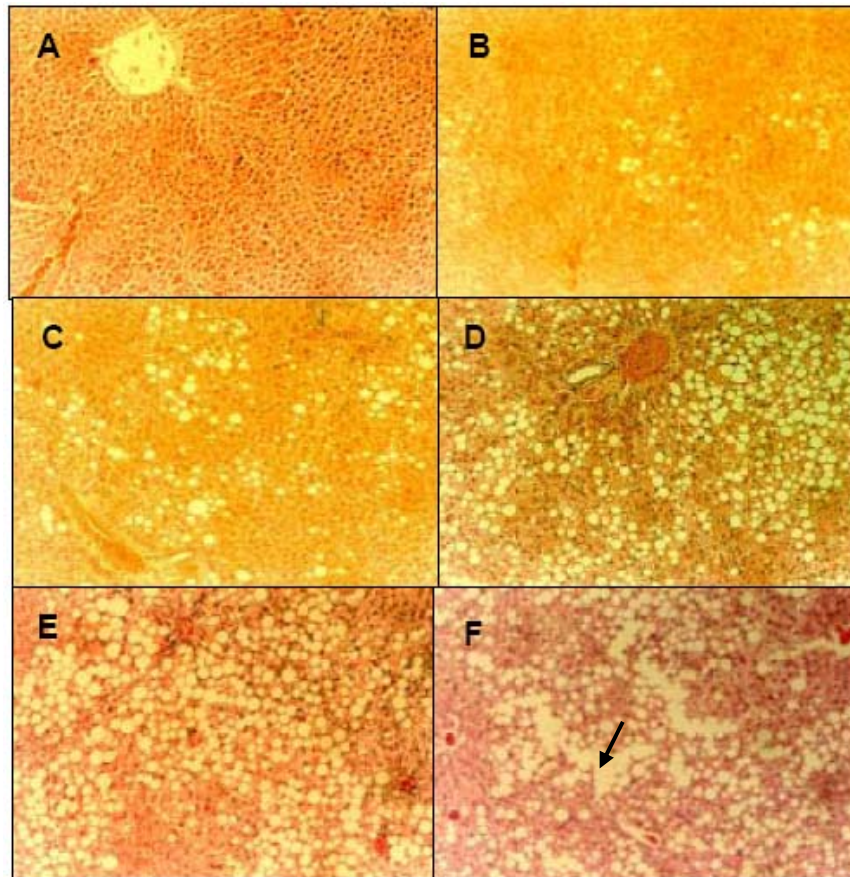
Para a presente investigação, foi procedida a extração dos lipídios totais das dietas e dos tecidos hepáticos, bem como a metilação de seus AG, conforme Folch et al. (1957), com adaptações.

#### 3.2.4.1 Extração dos lipídios totais das dietas e do tecido hepático

Foram adicionados às amostras de dieta e ao homogenato do tecido hepático (1,25mL de tampão fosfato pH 7,4/g de tecido) uma mistura de solventes (clorofórmio/metanol, 2:1; 5 mL/g de dieta ou de tecido hepático) e o antioxidante BHT a 0,005%. Após agitação vigorosa por 1 minuto, em agitador de tubos, a mistura foi mantida sob refrigeração, por 24 horas. Na seqüência, a mistura foi agitada por 4 horas, em agitador rotatório, acrescida de solução de NaCl a 0.9% (1mL/g de dieta ou de tecido hepático) e novamente agitada, em agitador de tubos, por 1 minuto. A fase clorofórmica, contendo os lipídios, foi coletada e à fase remanescente foi adicionado clorofórmio (2mL/g de dieta ou de tecido hepático) para agitação, por 1 minuto. As fases clorofórmicas resultantes foram agrupadas, filtradas em

sulfato de sódio anidro e transferidas para um balão de fundo redondo de 50mL para secagem em evaporador rotatório.

**Figura 1 - Cortes histológicos do fígado corados pelo método HE. Esteatose grau 0- ausência (A), grau 1- leve (B), grau 2- levemente moderado (C), grau 3- moderado (D), grau 4- grave (E) e grau 5- grave com presença de pseudocistos (seta) (F).**



Fonte: SILVA et al., 2008; ATAIDE et al., 2009.

### 3.2.5 Metilação

Depois de pesados, foram adicionados aos extratos lipídicos o hexano e o reagente de metilação  $\text{BF}_3$ /metanol (14% de trifluoreto de boro), ambos na proporção de 1mL/g de dieta ou de tecido hepático. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura ambiente, em agitador rotatório, por 30 horas. Após adição de água (1mL/g de dieta ou de tecido) as fases hexânica e aquosa foram separadas. A fração hexânica, contendo os ésteres metílicos, foi transferida para um balão de fundo redondo de 50mL, previamente pesado, e seca em evaporador rotatório. Logo após, a amostra metilada foi pesada em balança analítica,

adicionada de hexano HPLC (1mL/100 mg de amostra metilada) e mantida sob refrigeração em tubos com tampa de teflon.

Por fim, os ésteres metílicos de AG foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL. Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com uma coluna SPB-5, série us 108447-08B, com 30m de comprimento, 0,25 $\mu$ m de espessura e 0,25mm de diâmetro interno. Foi utilizado o He como gás de arraste, a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> e pressão de 50kPa. A temperatura inicial foi de 50°C, permanecendo constante durante 2 minutos, seguida de aumento progressivo de 4°C.min<sup>-1</sup> até atingir 250°C, permanecendo constante durante 15 minutos. As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas a 250°C e 310°C, respectivamente. O modo de controle de injeção foi o *Split*, com razão de 30:1. A espectrometria de massas foi realizada em um aparelho Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A acoplado ao cromatógrafo gasoso. Foram obtidos os espectros de massas por impacto eletrônico a 70 eV de todos os compostos sintetizados neste trabalho.

### 3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados segundo os pressupostos paramétricos de normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade das variâncias dos resíduos (teste de Levene). Após verificação de tais pressupostos, realizaram-se a análise de variância pelo teste F e, posteriormente, o teste Tukey-HSD (*Honestly significant difference*), ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Nemenyi, para comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos. Para os AG que apresentaram resíduos com uma distribuição normal padronizada e homocedásticos (mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico e  $\gamma$ -linolênico), foi realizada análise de variância (ANOVA) e suas médias foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Tukey-HSD. Para os demais AG (pentadecanóico, heptadecanóico e araquidônico), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (teste  $\chi^2$ ) e suas médias foram comparadas pelo teste *post-hoc* de Nemenyi.

Adicionalmente, foi realizado teste de correlação linear entre aqueles AG encontrados que apresentam alguma relação com o quadro de EH (palmítico, esteárico, palmitoléico, oléico,  $\gamma$ -linolênico) (AKASAWA et al., 2010; BARREYRO et al., 2007; CAVIGLIA et al., 2011; RICCHI et al., 2009) e grau de EH (GEH), PAF, PRF e os parâmetros bioquímicos

séricos: glicose, proteínas totais, ALT, AST, ALP e  $\gamma$ -GT. Foi realizado, ainda, teste de correlação linear entre o perfil lipídico sérico (TAG, colesterol total, LDL-c, HDL-c, VLDL-c e a relação LDL-c/HDL-c) e os AG com provável relação com tal perfil (palmítico e mirístico) (IDRIS e SUNDRAM, 2002). Foram aplicados os testes de correlação linear de Spearman entre as variáveis não paramétricas e de Pearson entre as variáveis paramétricas ( $p < 0,05$ ).

Em todos os casos optou-se por um nível de significância menor que 5,0% de probabilidade de erro experimental. Para todas as análises, foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 17.0.

### 3.2.7 Considerações éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, vinculado ao Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (ANS/MS/Brasil), tendo sido aprovado sob o número 004857/2009-20 (Anexo), baseado em normas internacionais (Declaração Universal dos Direitos do Animal – UNESCO - 15/10/1978) e nacionais (Lei 6.638 de 08/05/1979).

## 3.3 Resultados

Em relação às variáveis bioquímicas (Tabela 1), foi observada glicemia mais elevada no grupo AIN-93 1m em relação aos grupos AIN-93 4m e DCo 4m ( $p < 0,05$ ). Os níveis séricos de colesterol total, TAG, LDL-c, HDL-c, relação LDL-c/HDL-c e VLDL-c foram semelhantes entre todos os grupos de animais ( $p \geq 0,05$ ).

Dentre os marcadores de função e lesão hepáticas, observaram-se níveis menores de ALT e maiores de ALP no grupo AIN-93 1m, em relação ao DCo 4m ( $p < 0,01$ ). Para os demais marcadores, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados ( $p \geq 0,05$ ). Já os níveis de proteínas totais foram significativamente maiores nos animais do grupo AIN-93 4m, em relação aos dos grupos AIN-93 1m e DCo 1m ( $p < 0,05$ ). Os animais dos grupos DCo 1m e 4m também diferiram entre si ( $p < 0,05$ ).

A EH foi encontrada em 90% e 100% dos animais dos grupos AIN-93 1m e AIN-93 4m, respectivamente, contra, apenas, 20% dos animais do grupo DCo 4m e nenhum caso no grupo DCo 1m (Tabela 2). Os animais do grupo AIN-93 1m apresentaram o triplo (75%) do

número de casos graves, graus 4 e 5, em relação ao grupo AIN-93 4m (25%), contra nenhum caso grave nos animais submetidos à dieta comercial, conforme estadiamento da EH em ratos, estabelecido nos trabalhos de Ataíde et al. (2009) e Silva et al. (2008).

Em relação ao peso corporal final, conforme esperado, os animais mais velhos (grupos AIN-93 4m e DCo 4m) apresentaram médias mais elevadas que os animais mais jovens (grupos AIN-93 1m e DCo 1m), independentemente do tipo de dieta a que estavam submetidos ( $p < 0,01$ ; Tabela 2).

**Tabela 1 - Variáveis bioquímicas séricas dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m**

Variáveis bioquímicas	Grupos (n=10)			
	AIN-93 1m (m ± DP)	AIN-93 4m (m ± DP)	DCo 1m (m ± DP)	DCo 4m (m ± DP)
Glicemia (mg/dL)	182,33±21,56 <sup>a</sup>	48,00±26,41 <sup>b</sup>	82,00±37,34 <sup>a,b</sup>	68,75±18,67 <sup>b</sup>
Triacilgliceróis (mg/dL)	153,67±20,32 <sup>a</sup>	109,50±24,88 <sup>a</sup>	163,00±35,19 <sup>a</sup>	111,25±17,60 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg/dL)	85,33±7,01 <sup>a</sup>	49,00±8,58 <sup>a</sup>	75,00±12,13 <sup>a</sup>	57,75±6,07 <sup>a</sup>
LDL-c (mg/dL)	21,93±4,88 <sup>a</sup>	7,40±5,98 <sup>a</sup>	23,40±8,46 <sup>a</sup>	11,50±4,23 <sup>a</sup>
HDL-c (mg/dL)	32,67±2,44 <sup>a</sup>	24,50±2,99 <sup>a</sup>	19,00±4,23 <sup>a</sup>	24,00±2,11 <sup>a</sup>
LDL-c/HDL-c	0,67±0,16 <sup>a</sup>	0,32±0,20 <sup>a</sup>	1,23±0,28 <sup>a</sup>	0,47±0,14 <sup>a</sup>
VLDL-c (mg/dL)	30,73±4,06 <sup>a</sup>	21,90±4,98 <sup>a</sup>	32,60±7,04 <sup>a</sup>	22,25±3,52 <sup>a</sup>
Proteínas totais (g/dL)	5,67±0,15 <sup>a,b</sup>	6,55±0,19 <sup>c</sup>	5,20±0,26 <sup>a</sup>	6,22±0,13 <sup>b,c</sup>
ALT (U/L)	40,67±5,77 <sup>a</sup>	62,50±7,07 <sup>a,b</sup>	51,00±10,00 <sup>a,b</sup>	86,75±5,00 <sup>b</sup>
AST (U/L)	203,33±34,76 <sup>a</sup>	245,50±42,57 <sup>a</sup>	250,00±60,21 <sup>a</sup>	291,25±30,10 <sup>a</sup>
AST/ALT	5,11±0,60 <sup>a</sup>	3,89±0,73 <sup>a</sup>	4,90±1,03 <sup>a</sup>	3,45±0,52 <sup>a</sup>
ALP (U/L)	462,67±70,50 <sup>a</sup>	169,50±86,34 <sup>a,b</sup>	207,00±122,10 <sup>a,b</sup>	144,50±61,05 <sup>b</sup>
γ-GT (U/L)	2,00±0,26 <sup>a</sup>	1,50±0,32 <sup>a</sup>	2,00±0,46 <sup>a</sup>	1,25±0,23 <sup>a</sup>

Ausência de pelo menos uma letra igual na linha indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey-HSD.

Fonte: Autora, 2012.

O PAF dos animais do grupo AIN-93 1m foi inferior àquele observado no grupo AIN-93 4m ( $p < 0,05$ ), similar ao do grupo DCo 4m ( $p \geq 0,05$ ) e superior ao do grupo DCo 1m ( $p < 0,01$ ; Tabela 2). O PRF, no entanto, não diferiu significativamente entre os animais sob o mesmo tempo de exposição às diferentes dietas ( $p \geq 0,05$ ). O PRF do grupo AIN-93 1m foi superior ao dos grupos AIN-93 4m e DCo 4m ( $p < 0,01$ ). Os animais do grupo DCo 1m, por

sua vez, apresentaram valores mais elevados que os do grupo DCo 4m ( $p < 0,05$ ), não diferindo dos demais ( $p \geq 0,05$ ; Tabela 2).

**Tabela 2 – Frequência de esteatose hepática (EH), graus de esteatose hepática (GEH), peso corporal final (PCF), peso absoluto (PAF) e peso relativo (PRF) do fígado dos animais dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m**

Variáveis	Grupos (n=10)			
	AIN-93 1m	AIN-93 4m	DCo 1m	DCo 4m
EH <sup>1</sup> (%)	90,00 <sup>a</sup>	100,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	20,00 <sup>b</sup>
GEH <sup>1</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,20 <sup>b</sup>
PCF <sup>2</sup> (g)	152,94±10,35 <sup>a</sup>	285,42±12,68 <sup>b</sup>	132,77±17,92 <sup>a</sup>	261,34±8,96 <sup>b</sup>
PAF <sup>2</sup> (g)	6,55±1,48 <sup>a</sup>	8,07±1,28 <sup>b</sup>	4,19±1,08 <sup>c</sup>	6,98±0,52 <sup>a,b</sup>
PRF <sup>2,3</sup>	0,048±0,002 <sup>a</sup>	0,030±0,002 <sup>b,c</sup>	0,039±0,003 <sup>a,b</sup>	0,026±0,002 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Ausência de pelo menos uma letra igual na linha indica diferença significativa pela estatística de Kruskal-Wallis e teste de Nemenyi ( $p < 0,001$ ).

<sup>2</sup>Valores médios ± desvios-padrão. Ausência de pelo menos uma letra igual na linha indica diferença significativa pelo teste de Tukey-*HSD* ( $p < 0,05$ ).

<sup>3</sup> Peso do fígado em relação ao peso corporal do animal.

Fonte: Autora, 2012.

Em virtude da quantidade observada na análise cromatográfica das diferentes amostras, os AG discutidos no presente trabalho são: mirístico (tetradecanóico; C14:0), pentadecanóico (C15:0), palmítico (hexadecanóico; C16:0), palmitoléico (*cis*-9-hexadecenóico; C16:1 $\Delta^9$ ), margárico (heptadecanóico; C17:0), esteárico (octadecanóico; C18:0), oléico (*cis*-9-octadecenóico; C18:1 $\Delta^9$ ), linoléico (*todo-cis*-9,12-octadecadienóico; C18:2 $\Delta^{9,12}$ ),  $\gamma$ -linolênico (*todo-cis*-6,9,12-octadecatrienóico; C18:3 $\Delta^{6,9,12}$ ) e araquidônico (*todo-cis*-5,8,11,14-eicosatetraenóico; C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ ). Diferenças significativas entre os grupos de animais foram observadas para os AG heptadecanóico, araquidônico, oléico e esteárico ( $p < 0,05$ ; Tabelas 3 e 4).

Dentre os AG analisados, apenas o pentadecanóico, o heptadecanóico e o araquidônico não apresentaram resíduos com uma distribuição normal padronizada e homocedásticos (Tabela 3). O pentadecanóico não diferiu entre os grupos estudados ( $p \geq 0,05$ ), provavelmente devido às baixas concentrações observadas. Os grupos expostos à dieta AIN-93 apresentaram níveis similares de ácido heptadecanóico entre si e entre o grupo DCo 4m, e valores significativamente menores em relação ao grupo DCo 1m que, por sua vez, foi similar aos animais mais velhos expostos a mesma dieta ( $p \geq 0,05$ ). Da mesma forma, o AGPI araquidônico não diferiu entre os grupos submetidos às mesmas dietas, independente do

tempo de exposição ( $p \geq 0,05$ ); no entanto, foi encontrado em menor quantidade nos grupos expostos à dieta AIN-93, quando comparados ao grupo DCo 1m, e somente no grupo AIN-93 1m em relação ao DCo 4m.

**Tabela 3 - Escores médios percentuais de ácidos graxos do tecido hepático dos ratos dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m**

Ácidos graxos	Grupos (n=10)			
	AIN-93 1m	AIN-93 4m	DCo 1m	DCo 4m
Pentadecanóico	0,1302 <sup>a</sup>	0,1086 <sup>a</sup>	0,3999 <sup>a</sup>	0,1174 <sup>a</sup>
Heptadecanóico	0,1271 <sup>a</sup>	0,1184 <sup>a</sup>	1,0168 <sup>b</sup>	0,3196 <sup>a,b</sup>
Araquidônico	3,2872 <sup>a</sup>	7,9444 <sup>a,c</sup>	15,4192 <sup>b</sup>	8,6614 <sup>b,c</sup>

Ausência de pelo menos uma letra igual na linha indica diferença significativa pela estatística de Kruskal Wallis e teste de Nemenyi ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Autora, 2012.

O AG encontrado em maior concentração no tecido hepático dos animais foi o saturado de cadeia longa palmítico, que não apresentou diferença estatística entre os grupos ( $p \geq 0,05$ ; Tabela 4). Contudo, este AG se correlacionou de forma positiva com o GEH ( $r = 0,520$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 2 A); de forma negativa com a AST ( $r = -0,389$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 3 A) e, curiosamente, não se correlacionou com nenhum parâmetro bioquímico relacionado ao perfil lipídico sérico.

**Tabela 4 - Valores médios percentuais de ácidos graxos do tecido hepático dos ratos dos grupos AIN-93 1m, AIN-93 4m, DCo 1m e DCo 4m**

Ácidos graxos	Grupos (n=10)			
	AIN-93 1m (%; média ± DP)	AIN-93 4m (%; média ± DP)	DCo 1m (%; média ± DP)	DCo 4m (%; média ± DP)
Mirístico	0,5724 ± 0,1821 <sup>a</sup>	0,5525 ± 0,1628 <sup>a</sup>	0,3837 ± 0,1278 <sup>a</sup>	0,3458 ± 0,2414 <sup>a</sup>
Palmítico	35,2083 ± 6,9955 <sup>a</sup>	31,5695 ± 7,7371 <sup>a</sup>	26,2271 ± 5,2491 <sup>a</sup>	31,8690 ± 9,3408 <sup>a</sup>
Esteárico	10,2651 ± 3,1273 <sup>a</sup>	11,0518 ± 2,7769 <sup>a</sup>	22,6198 ± 5,7776 <sup>b</sup>	17,1780 ± 4,5616 <sup>c</sup>
Palmitoléico	2,6239 ± 1,6667 <sup>a</sup>	3,0373 ± 1,5452 <sup>a</sup>	1,6584 ± 0,9894 <sup>a</sup>	1,6164 ± 1,0524 <sup>a</sup>
Oléico	28,1957 ± 3,1824 <sup>a</sup>	27,1499 ± 4,5357 <sup>a</sup>	17,5844 ± 4,4820 <sup>b</sup>	18,8169 ± 3,4620 <sup>b</sup>
Linoléico	18,7429 ± 7,2744 <sup>a</sup>	19,3324 ± 6,1072 <sup>a</sup>	15,2394 ± 4,3470 <sup>a</sup>	18,1259 ± 4,4370 <sup>a</sup>
$\gamma$ -Linolênico	0,1543 ± 0,0424 <sup>a</sup>	0,2390 ± 0,1014 <sup>a</sup>	0,1709 ± 0,0279 <sup>a</sup>	0,1435 ± 0,0242 <sup>a</sup>

Ausência de pelo menos uma letra igual na linha indica diferença significativa pelo teste de Tukey-HSD ( $p < 0,05$ ).

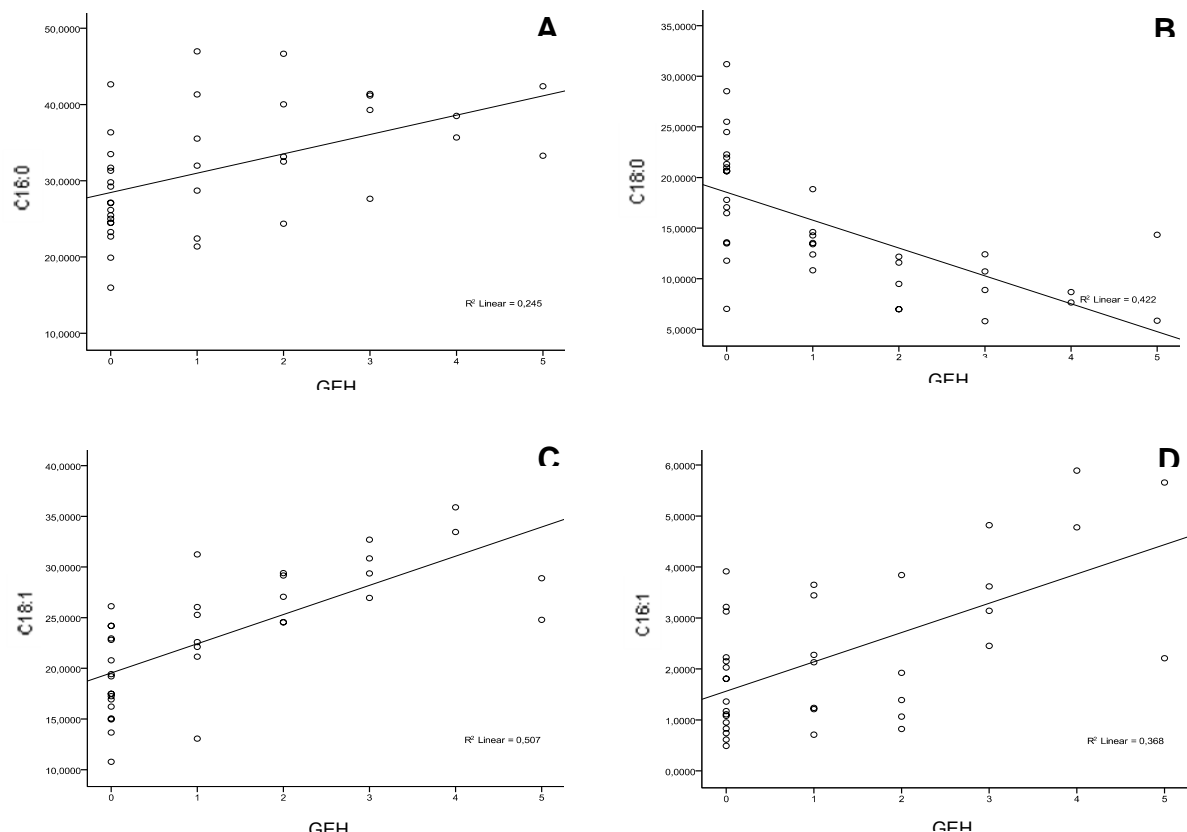
Fonte: Autora, 2012.



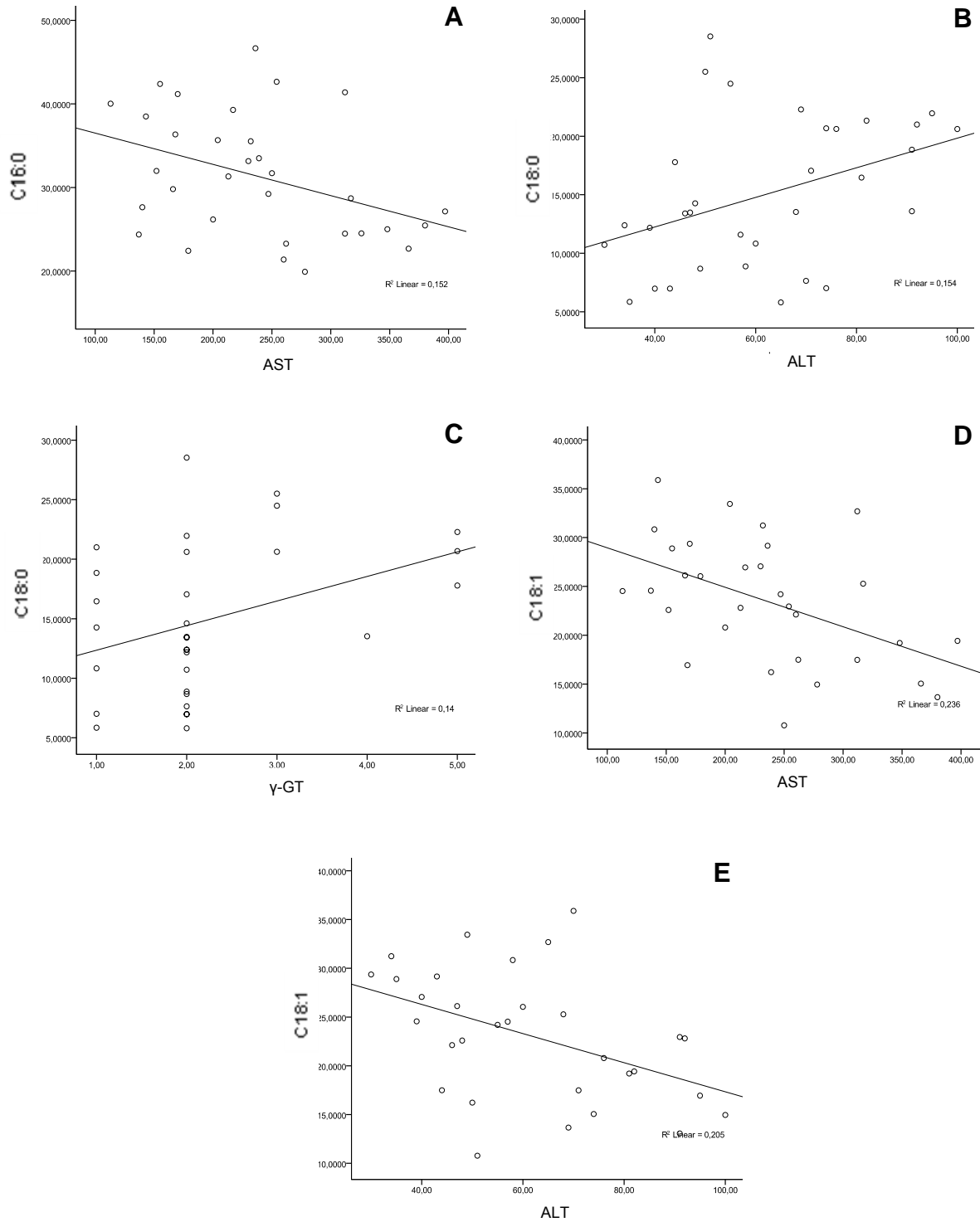
Em relação aos AG monoinsaturados (AGMI), foram encontrados o ácido oléico e o palmitoléico. Enquanto não foi observada diferença nas concentrações de ácido palmitoléico entre os grupos estudados (Tabela 4), os grupos expostos à dieta AIN-93 apresentaram níveis maiores de ácido oléico em relação aos expostos à dieta comercial, independente do tempo de exposição ( $p < 0,05$ ; Tabela 4). Em relação às análises de correlação, observou-se forte correlação linear positiva do AG oléico e do palmitoléico com o GEH ( $r = 0,765$ , para o oléico, e  $r = 0,501$ , para o palmitoléico;  $p < 0,01$ ; Figura 2 C e D, respectivamente). Observaram-se, ainda, correlação positiva entre o ácido oléico e o PAF ( $r = 0,413$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 4 B) e negativa com AST ( $r = -0,486$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 3 D) e ALT ( $r = -0,452$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 3 E).

Dentre os AGPI da família  $\omega$ -6, além do ácido araquidônico, foram encontrados o ácido linoléico e o  $\gamma$ -linolênico, cujas concentrações não diferiram entre os grupos de animais ( $p \geq 0,05$ ; Tabela 4). Este último não apresentou correlação linear significativa com nenhum parâmetro possivelmente relacionado ao processo de infiltração gordurosa observado nos animais ( $p \geq 0,05$ ).

**Figura 2 – Correlação linear de Spearman entre o grau de esteatose hepática (GEH) e os ácidos graxos palmítico (C16:0; A), esteárico (C18:0; B), oléico (C18:1; C) e palmitoléico (C16:1; D).**

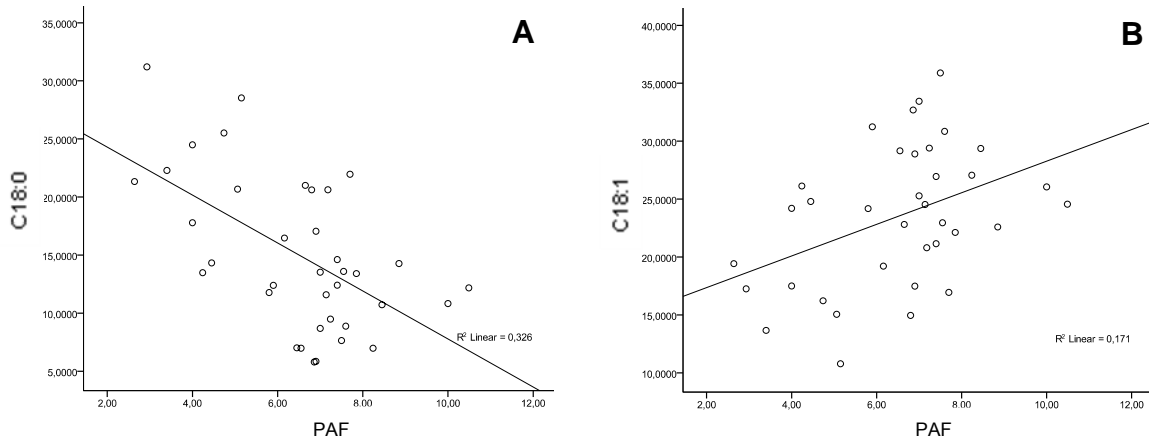


**Figura 3 – Correlação linear de Pearson entre aspartato aminotransferase (AST) e o ácido palmítico (C16:0) (A) e entre alanina aminotransferase (ALT) e o ácido esteárico (C18:0) (B); correlação linear de Spearman entre gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -GT) e o ácido graxo esteárico (C18:0) (C); correlação linear de Pearson entre o ácido graxo oléico (C18:1) e AST (D) e ALT (E).**



Fonte: Autora, 2012.

**Figura 4 – Correlação linear de Pearson entre o peso absoluto do fígado (PAF) e o ácido graxo esteárico (C18:0) (A) e o ácido oléico (C18:1) (B).**



Fonte: Autora, 2012.

Os valores percentuais aproximados dos AG mais abundantes nas dietas AIN-93 e comercial estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5 - Valores percentuais aproximados dos ácidos graxos mais abundantes nas dietas AIN-93 e comercial**

Ácidos graxos (%)	Dietas	
	AIN-93	Comercial
Palmítico	9,4600	19,5830
Esteárico	3,8800	3,5200
Oléico	15,4600	28,0190
Linoléico	42,3100	48,3410

Fonte: Autora, 2012.

### 3.4 Discussão

A dieta AIN-93 peletizada, diferente da dieta comercial, induziu o maior número de casos de EH observados neste estudo, caracterizando especialmente um quadro agudo, uma vez que os animais mais jovens apresentaram os casos mais graves. Apesar das modificações

na versão anterior (AIN-76A), particularmente em seu conteúdo em sacarose, colina e no aminoácido sulfurado metionina, o problema persiste, sugerindo que a versão atual ainda não representa a formulação mais apropriada para a alimentação de roedores de laboratório, especialmente na fase de crescimento. Possíveis diferenças na composição das dietas investigadas, a exemplo do conteúdo em compostos lipotróficos e da distribuição de macronutrientes, poderiam justificar o surgimento do quadro de EH aqui observado (SILVA et al. 2008).

A alta glicemia observada no grupo AIN-93 1m, o único com níveis significativamente superiores aos grupos de animais mais velhos, independente do tipo de dieta a que estavam submetidos, embora semelhante aos animais de mesma idade recebendo a dieta comercial, pode ter um importante significado biológico, uma vez que o aumentado aporte de glicose para o fígado está relacionado ao desenvolvimento de EH, observada em frequência e gravidade superiores nos grupos alimentados com a dieta purificada.

Curiosamente, não foi observada diferença significativa no perfil lipídico sérico dos animais dos diferentes grupos, apesar da associação entre a DFGNA e a patogênese da dislipidemia (ADIELS; TASKINEN; BORÉN, 2008; SAVAGE e SEMPLE, 2010). Tampouco foi observada correlação linear entre os AG palmítico e mirístico hepáticos e o perfil lipídico sérico, provavelmente pela ausência de diferença entre os grupos, em todos os parâmetros considerados.

A análise do PAF e do PRF evidenciou a importância da EH para a determinação do peso do fígado dos animais. O grupo AIN-93 1m, com 90% dos animais acometidos por EH, 75% dos quais portadores dos casos mais graves, graus 4 e 5, apresentou PAF similar àquele do grupo DCo 4m, de animais mais velhos, com apenas 20% de casos de EH, não graves. Adicionalmente, foi superior ao do grupo DCo 1m, de idade semelhante, sem EH. Em relação ao PRF, normalmente superior em animais mais jovens, não foi observada diferença significativa entre os animais do grupo DCo 1m e os do grupo AIN-93 4m, apesar da diferença de idade. Quanto ao PCF, os animais mais velhos apresentaram médias mais elevadas que os animais mais jovens, conforme esperado, independentemente do tipo de dieta a que estavam submetidos ( $p < 0,01$ ).

A partir da observação do quadro de EH nos animais, procedeu-se à investigação da influência da composição em AG das dietas sobre o perfil em AG do tecido hepático e

possíveis associações deste perfil com a esteatose encontrada. Diversos estudos têm investigado tal influência, através de utilização de diferentes fontes alimentares. Dentre estes, encontram-se os trabalhos de Clamp et al. (1997), que utilizaram dieta comercial, dieta rica em manteiga, óleo de coco, óleo de milho ou óleo de peixe; Sabarese (2003), que utilizou a dieta AIN-93, uma dieta rica em AG *trans* ou rica em AG essenciais; Radcliffe et al. (2004), que utilizaram uma dieta purificada com óleo de milho ou óleo de semente de algodão; Taha et al. (2005), que investigaram dieta normolipídica ou cetogênica; e, Bueno et al. (2010), que analisaram os efeitos da dieta AIN-93 em sua constituição original e AIN-93 com substituições da fonte lipídica por um óleo experimental, rico em triptanoína e dieptanoína.

Assim como nos estudos citados, na presente investigação o ácido mirístico foi encontrado em quantidades bastante modestas, e, neste trabalho, sem diferença entre os grupos estudados, possivelmente pelo seu rápido metabolismo. Este AG é, normalmente, encontrado em níveis abaixo de 1% do total de AG em células de mamíferos (RIOUX et al., 2005), pois, é preferencialmente oxidado, via  $\beta$ -oxidação, ou alongado, resultando em palmitato (RIOUX; LEMARCHAL; LEGRAND, 2000). A combinação dessas vias metabólicas possivelmente contribui para os baixos níveis do ácido mirístico no tecido hepático, apesar da existência de vias alternativas para sua síntese, como o encurtamento do palmitato pela  $\beta$ -oxidação microsomal ou a alongação do laurato (RIOUX; CATHELINE; LEGRAND, 2007).

A elevada concentração hepática de ácido palmítico aqui observada corrobora outros estudos sobre o perfil lipídico hepático (CLAMP et al., 1997; RADCLIFFE et al., 2004) e pode ser facilmente justificada, uma vez que o palmitato é o AG preferencialmente formado pelo complexo da ácido graxo sintase, em mamíferos, através do processo de alongamento da cadeia acila (JAYAKUMAR et al., 1995). No entanto, não houve diferença entre os grupos em relação a este AG, apesar dos níveis relativamente maiores na dieta comercial em relação à dieta AIN-93 (Tabela 5).

No contexto da EH, apesar de os grupos não terem apresentado diferença entre si com relação ao ácido palmítico, sua concentração hepática se correlacionou positivamente com o GEH, como esperado. Este AG é promotor do acúmulo hepático de TAG (CAVIGLIA et al., 2011; LI et al., 2009), além de ser um potente indutor de citocinas pró-inflamatórias (JOSHI-BARVE et al. 2007), da redução na síntese de antioxidantes (SRIVASTAVA e CHAN, 2008), da lipoapoptose (LEE et al., 2010; LI et al., 2009) e da diminuição da expressão do receptor

da insulina, o que pode resultar em resistência a este hormônio (RUDDOCK e al., 2008). Dessa forma, a correlação positiva encontrada é um fator desfavorável no que diz respeito ao prognóstico da EH encontrada.

Curiosamente, em relação ao ácido esteárico, os grupos expostos à dieta AIN-93 apresentaram níveis mais baixos do que os demais. Tais resultados condizem com a metabolização preferencial deste AG, através da enzima estearoil-CoA dessaturase (*stearoyl-CoA desaturase* - SCD), resultando em ácido oléico (MIYAZAKI et al., 2001), uma vez que a SCD é ativada pelo fator de transcrição SREBP-1c (Proteína ligadora do elemento de resposta aos esteróis-1c, *Sterol regulatory element binding protein 1c*), que está estreitamente relacionado à esteatogênese, através de mecanismos lipogênicos (EDWARDS et al. 2000).

Assim, os níveis significativamente mais baixos de ácido esteárico e mais altos de ácido oléico nos grupos de animais submetidos à dieta AIN-93, apesar da composição das duas dietas (Tabela 5), além da correlação negativa aqui observada entre o AG esteárico e o GEH, podem sugerir uma alta atividade da SCD (ARENDETT et al., 2009), enzima-chave para o desenvolvimento da EH, capaz de controlar a oxidação lipídica e a lipogênese hepática (DOBRZYN e NTAMBI, 2005). Estudos apontam o ácido esteárico como promotor de processos associados ao surgimento e à progressão da EH (BARREYRO et al., 2007; NISHITANI et al., 2007).

A relação entre o AG oléico e o quadro de EH poderia ser justificada, ainda, pelo fato deste AG ser o substrato preferencial da Acil-CoA colesterol aciltransferase e diacilglicerol aciltransferase, enzimas responsáveis pela síntese de ésteres de colesterol e TAG, respectivamente (NTAMBI e MIYAZAKI, 2003). Adicionalmente, a exposição ao AG oleico, *in vitro*, está associada ao aumento na expressão de fatores de transcrição envolvidos em mecanismos lipogênicos, como a SREBP-1c e o receptor ativado por proliferadores de peroxissomos- $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor* - PPAR- $\gamma$ ) (RICCHI et al., 2009), à diminuição na expressão do fator de transcrição de genes envolvidos na oxidação de AG, o PPAR- $\alpha$  (CUI; CHEN; HU, 2010), e ao aumento na expressão da proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (*adipose differentiation-related protein* - ADRP) (FAN et al., 2009), proteína associada à formação de gotículas lipídicas e ao acúmulo de TAG (FUKUSHIMA et al., 2005). Portanto, a quantidade significativamente maior de ácido oléico encontrada nos grupos AIN-93 e a correlação linear positiva entre os níveis deste AG, o GEH e o PAF poderiam assim ser justificados.

Os resultados dos marcadores de função e lesão hepática aqui observados indicam que tais parâmetros bioquímicos não pareceram guardar relação com o quadro de EH, uma vez que não diferiram entre os grupos de animais estudados. No entanto, observou-se correlação negativa entre os níveis hepáticos de ácido oléico e AST e ALT e correlação positiva entre ALT e  $\gamma$ -GT com o ácido esteárico. Apesar da aparente inconsistência dos dados, há diferentes relatos sobre a influência da EH sobre os níveis de aminotransferases. Neste contexto, Marchesini et al. (2001) encontraram níveis de ALT e AST elevados em até cinco vezes o limite superior de normalidade na DFGNA. Em contrapartida, um recente estudo de base populacional observou que apenas 55% de indivíduos com ALT elevada têm DFGNA (BEDOGNI et al., 2005). Embora estes estudos considerem a presença de EHNA, que determina a elevação dos níveis de aminotransferases, outro grande estudo de base populacional relatou que 79% dos pacientes portadores de EH apresentam níveis normais de aminotransferases (BROWNING et al., 2004). Neste sentido, Ravel (1997) afirma que na EH os marcadores de lesão hepática são variáveis, podendo até mesmo não apresentar nenhuma anormalidade, principalmente nos casos não complicados. Assim, os resultados aqui encontrados refletem a controvérsia observada na literatura, sugerindo a existência de causas mais relevantes na determinação dos níveis dessas enzimas, no contexto da EH.

Assim como no estudo de Bueno et al. (2010) e Clamp et al. (1997), além do AG oléico, outro AGMI aqui encontrado foi o palmitoléico, o que pode ser justificado pela capacidade limitada do fígado de mamíferos em dessaturar AGS, que só é possível até a posição  $\Delta^9$  (GERMAN e DILLARD, 2004), associada à baixa concentração de outros AGMI nas dietas. Outros estudos encontraram, ainda, os AGMI eicosenóico (SABARENSE, 2003) e o tetracosenóico (ALMEIDA et al., 2009).

Os estudos acerca das funções do ácido palmitoléico são escassos, talvez devido a sua baixa concentração nos tecidos. Investigações sobre o efeito deste AG dietético na colesterolemia revelam comportamento semelhante ao de AGS, e não ao de um AGMI (NESTEL; CLIFTON; NOAKES, 1994). Estudos semelhantes também observaram a presença deste AG, porém, em quantidades relativamente menores que as aqui encontradas (CLAMP et al., 1997; SABARENSE, 2003).

O ácido palmitoléico se correlacionou positivamente com o GEH, corroborando estudos que observaram que este AG é capaz de acentuar a EH induzida pelo ácido palmítico, *in vitro* (AKASAWA et al., 2010). Contudo, em estudos *in vivo*, este AG apresentou uma

baixa citotoxicidade celular, quando comparado aos AGS (MALHI et al., 2006), podendo até mesmo exercer um papel citoprotetor, em relação à toxicidade mediada por outros AG (AKASAWA et al., 2010). Quando administrado cronicamente, pode, ainda, reduzir a resistência à insulina e o acúmulo de lipídeos hepáticos (YANG; MIYAHARA; HATANAKA, 2011).

No tocante aos AGPI, os grupos não apresentaram diferença em relação ao ácido linoléico ( $p \geq 0,05$ ), como era de se esperar, uma vez que a composição neste AG é semelhante entre as dietas (Tabela 5).

Com relação ao ácido araquidônico, foram encontrados níveis menores no fígado dos animais do grupo AIN-93 1m, que apresentaram os casos mais graves de EH. Algumas células inflamatórias são capazes de metabolizar araquidonato em eicosanóides bioativos, levando a uma mudança na concentração deste AG no tecido lesionado, a exemplo do tecido hepático acometido de infiltração gordurosa severa (NEEDLEMAN et al., 1986), como observado no presente estudo.

Assim como nesta investigação, Bueno et al. (2010) observaram a presença do AG  $\gamma$ -linolênico em suas análises, embora, outros autores, em estudos semelhantes, não o tenham encontrado (CLAMP et al., 1997; RADCLIFFE et al., 2004; SABARENSE, 2003; TAHA et al., 2005). Este AG é sintetizado no organismo a partir da dessaturação do ácido linoléico pela  $\Delta 6$ -dessaturase e rapidamente alongado para dihomô  $\gamma$ -linolênico, podendo ser incorporado aos fosfolipídios de membrana, ou, em menor proporção, sofrer ação da  $\Delta 5$ -dessaturase e ser convertido em ácido araquidônico. O ácido dihomô  $\gamma$ -linolênico tecidual compete com o ácido araquidônico pelo acesso às enzimas cicloxigenases e lipoxigenases, produzindo prostaglandinas da série 1 e tromboxano A1, que possuem ação anti-inflamatória, vasodilatadora e anti-agregante, e diminuindo a produção de eicosanóides derivados do ácido araquidônico (KAPOOR e NAIR, 2005).

A modulação de vias envolvidas no processo lipotóxico e/ou lipogênico influenciado pelos AG teciduais ou livres é uma potencial estratégia terapêutica para a EH, uma vez que pode modificar o seu prognóstico, evitando ou reduzindo as possibilidades de progressão para EHNA e carcinoma hepatocelular. Neste sentido, a dieta, no que diz respeito ao teor em compostos lipotróficos, como metionina e colina, aos carboidratos simples, pela possibilidade de lipogênese *de novo*, e à composição em AG, uma vez que os AG teciduais são passíveis de



modulação pela dieta, dentre outros fatores, deve ser considerada. Atenção especial deve ser dada para a ingestão dos AG palmítico, esteárico, oléico e palmitoléico, com reconhecida influência sobre a DFGNA (BUETTNER et al., 2006; LISTENBERGER et al., 2003; NISHITANI et al., 2007; WEIGERT et al., 2004), corroborada com os achados do presente trabalho, particularmente no contexto da EH.

### **3.5 Conclusão**

As diferentes dietas utilizadas no presente estudo exerceram influência sobre o perfil em AG do tecido hepático dos animais, apesar de as modificações metabólicas sofridas pelos AG após a sua incorporação tenham, provavelmente, dificultado a associação direta entre o perfil em AG das dietas consumidas e o perfil dos tecidos hepáticos analisados. Fatores endógenos, especialmente a lipogênese *de novo* e a modulação dos AG nas membranas dos tecidos, de difícil mensuração, devem ser considerados. O tempo de exposição às dietas, no entanto, não pareceu influenciar o perfil em AG do tecido hepático dos animais, exceto em relação ao ácido esteárico, particularmente no grupo exposto à dieta comercial.

No que se refere à EH, o perfil em AG do tecido hepático guardou relação com a infiltração gordurosa observada nos animais, particularmente em relação aos AG oléico e esteárico, bem como às associações entre o ácido oléico, o esteárico, o palmítico e o palmitoléico com o GEH, com possíveis repercussões sobre o prognóstico da doença.

## REFERÊNCIAS

1. ADIELS, M.; TASKINEN, M.; BORÉN, J. Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia. **Curr Diabetes Rep**, v. 8, n. 1, p. 60-64, feb, 2008.
2. AKAZAWA, Y. et al. Palmitoleate attenuates palmitate-induced bim and PUMA upregulation and hepatocyte lipoapoptosis. **J Hepatol**, v. 52, n. 4, p. 586–593, april 2010.
3. ALLARD, J.P. et al. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A cross-sectional study. **J Hepatol**, v. 48, p. 300–307, 2008.
4. ALMEIDA, M.E.F. et al. Perfil lipídico tecidual de ratos alimentados com diferentes fontes lipídicas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 51-60, jan./fev. 2009.
5. AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standarts for nutritional studies. **J Nutr**, v. 107, n. 7, p.1340-8, 1977.
6. ARAYA, J. et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n–6/n–3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci**, v. 106, p. 635–643, 2004.
7. ARENDT, B.M. et al. Hepatic Fatty Acid Composition Differs between Chronic Hepatitis C Patients with and without Steatosis. **J Nutr**, v. 139, p. 691–695, 2009.
8. ATAÍDE, T.R. et al. Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. **Int J Food Sci Technol**, v. 44, p. 484-92, 2009.
9. ATWATER, W.O.; BRYANT, A.P. Dietary studies of university boat crews. USDA Office of Experiment Stations Bulletin 75. Government Printing Office, Washington, DC. 1900.
10. BARBOSA, J.H.P. Dietas padrão utilizadas em experimentação animal: uma análise comparativa. 2008. Dissertação (mestrado em nutrição) - Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2008.
11. BARREYRO, F.J. et al. Transcriptional Regulation of Bim by FoxO3A Mediates Hepatocyte Lipoapoptosis. **J Biol Chem**, v. 282, n. 37, p. 27141–54, sep. 2007.
12. BEDOGNI, G. et al. Prevalence of and Risk Factors for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Dionysos Nutrition and Liver Study. **Hepatology**, v. 42, n. 1, p. 44-52, 2005.
13. BERRY, E.M.; HIRSCH, J. Does dietary linolenic acid influence blood pressure? **Am J Clin Nutr**, v. 44, p. 336-340, 1986.
14. BROWNING, J. D. et al. Prevalence of Hepatic Steatosis in an Urban Population in the United States: Impact of Ethnicity. **Hepatology**, v. 40, p. 1387–1395, dec. 2004.

15. BUENO, N.B. et al. Perfil em ácidos graxos hepáticos de ratos com esteatose induzida pela dieta AIN-93 atenuada pela substituição parcial do óleo de soja por dieptanoína e trieptanoína. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 6, p. 584-87, 2010.
16. BUETTNER, R. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36, p. 485-501, 2006.
17. CAVIGLIA, J.M. et al. Different fatty acids inhibit apolipoprotein B100 secretion by different pathways: Unique roles for endoplasmic reticulum stress, ceramide, and autophagy. **J Lipid Res**, v. 52, n. 9, p. 1636-51, sep. 2011.
18. CLAMP, A.G. et al. The Influence of Dietary Lipids on the Composition and Membrane Fluidity of Rat Hepatocyte Plasma Membrane. **Lipids**, v. 32, p. 179-184, 1997.
19. CUI, W.; CHEN, S.L.; HU, K. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. **Am J Transl Res**, v. 2, n. 1, p. 95-104, 2010.
20. DOBRZYN, A.; NTAMBI, J.M. Stearoyl-CoA desaturase as a new drug target for obesity treatment. **Obes Rev**, v. 6, p. 169-74, 2005.
21. EDWARDS, P.A. et al. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. **Biochim Biophys Acta**, v. 15, n. 1529(1-3), p. 103-13, dec. 2000.
22. FAN, B. et al. Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.297, E112-E123, 2009.
23. FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, p. 497-509, 1957.
24. FRIEDEWALD, W.T.; LEVI, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.
25. FUKUSHIMA, M. et al. Adipose differentiation related protein induces lipid accumulation and lipid droplet formation in hepatic stellate cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 41, n. 10, p. 321-4. nov.dec. 2005.
26. GERMAN, J.B. Dietary lipids from an evolutionary perspective: sources, structures and functions. **Matern Child Nutr**, v. 7 (Suppl. 2), p. 2-16, 2011.
27. GERMAN, J.B.; DILLARD, C.J. Saturated fats: what dietary intake? **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 550-9, 2004.
28. IBRAHIM, A.; NATARAJAN, S.; GHAFLOORUNISSA. Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats. **Metab Clin Exp**, v. 54, p. 240-6, 2005.

29. IDRIS, C.; SUNDRAM, K. Effect of dietary cholesterol, trans and saturated fatty acids on serum lipoproteins in non-human primates. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 11, p. 408-15, 2002.
30. JAYAKUMAR, A. et al. Chirala, and S.J. Wakil. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. **Proc Natl Acad Sci**, v. 92, p. 8695–99, 1995.
31. JOSHI-BARVE, S. et al. Palmitic Acid Induces Production of Proinflammatory Cytokine Interleukin-8 from Hepatocytes. **Hepatology**, v. 46, p. 823-830, 2007.
32. KAPOOR, R.; NAIR, H. Gamma Linolenic Acid Oils. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. 6<sup>th</sup> ed. Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. 2005.
33. KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17(7/8), p. 669-73, 2001.
34. KLURFELD, D.M. Kidney and bladder stones in rodents fed purified diets. **J Nutr**, v. 132, n. 12, p. 3784, 2002.
35. LEE, J.Y. et al. Dietary Oleate Has Beneficial Effects on Every Step of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression in a Methionine- and Choline-Deficient Diet-Fed Animal Model. **Diabetes Metab J**, v. 35, n. 5, p. 489–496, oct. 2011.
36. LEE, M. et al. Regulation of Hepatic Gluconeogenesis by an ER-Bound Transcription Factor, CREBH. **Cell Metabolism**, v. 11, p. 331–339, April 2010.
37. LI, Z.Z. et al. Hepatic Lipid Partitioning and Liver Damage in Nonalcoholic Fatty Liver Disease - Role of stearyl-coa desaturase. **J Biol Chem**, v. 284, n. 9, p. 5637–5644, Feb. 2009.
38. LISTENBERGER, L.L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **PNAS**, v. 100, n. 6, p. 3077–3082, mar. 2003.
39. MALHI, H. et al. Free Fatty Acids Induce JNK-dependent Hepatocyte Lipoapoptosis. **J Biol Chem**, v. 281, n. 17, p. 12093–12101, apr. 2006.
40. MARCHESINI, G. et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease A Feature of the Metabolic Syndrome. **Diabetes**, v. 50, p. 1844–1850, 2001.
41. MCDONALD, R.B. Some considerations for the development of diets for mature rodents used in long-term investigations. **J Nutr**, v.127 (5 Suppl), 847S-850S, 1997.
42. MEAD, M.N. The Feed Factor. Estrogenic variability in lab animal diets. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 11, p. A640-2, 2006.
43. MEDINSKY, M.A. et al. Development of hepatic lesions in male Fischer-344 rats fed AIN-76A purified diet. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 62, n. 1, p. 111-20, 1982.

44. MIYAZAKI, M. et al. Oleoyl-CoA is the major *de novo* product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. **J Biol Chem**, v. 276, n. 42, p. 39455-61, 2001.
45. NEEDLEMAN, P. et al. Arachidonic Acid Metabolism. **Ann Rev Biochem**, v. 55, p. 69-102, 1986.
46. NESTEL, P.; CLIFTON, P.; NOAKES, M. Effects of increasing dietary palmitoleic acid compared with palmitic and oleic acids on plasma lipids of hypercholesterolemic men. **J Lipid Res**, v. 35, p. 656-62, 1994.
47. NEUSCHWANDER-TETRI, B. A.; CALDWELL, S. H. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202-1219, 2003.
48. NISHITANI, Y. et al. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes. **Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi**, v. 42, n. 1, p. 32-5, Feb. 2007.
49. NTAMBI, J.M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Prog Lipid Res**, v. 43, p. 91-104, 2003.
50. PAN, D.A.; STORLIEN, L.H. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. **J Nutr**, v. 123, n. 3, p. 512-9, 1993.
51. RADCLIFFE, J.D.; CZAJKA-NARINS, D.M.; IMRHAN, V. Fatty Acid Composition of Serum, Adipose Tissue, and Liver in Rats Fed Diets Containing Corn Oil or Cottonseed Oil. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 59, p. 73-77, 2004.
52. RAO, G.N.; MORRIS, R.W.; SEELY, J.C. Beneficial effects of NTP-2000 diet on growth, survival, and kidney and heart diseases of Fischer 344 rats in chronic studies. **Toxicol Sci**, v. 63, n. 2, p. 245-55, Oct. 2001.
53. RAVEL, R. Laboratório Clínico. Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
54. REEVES, P.G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **J Nutr**, v. 127, p. 838S-841S, 1997.
55. REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
56. RICCHI, M. et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 24, p. 830-840, 2009.
57. RIOUX, V. et al. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. **Reprod Nutr Dev**, v.45, p. 599-612, 2005.

58. RIOUX, V.; CATHELIN, D.; LEGRAND, P. In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic acid shortening and lauric acid elongation. **Animal**, v. 1, n. 6, p. 820–826, 2007.
59. RIOUX, V.; LEMARCHAL, P.; LEGRAND, P. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. **J Nutr Biochem**, v. 11, p. 198–207, 2000.
60. RUDDOCK, M.W. et al. Saturated fatty acids inhibit hepatic insulin action by modulating insulin receptor expression and post-receptor signalling. **J Biochem**, v. 215, p. 171-89, 2008.
61. SABARENSE, C.M. Avaliação do efeito dos ácidos graxos *trans* sobre o perfil dos lipídios teciduais de ratos que consumiram diferentes teores de ácidos graxos essenciais. 2003. Tese (Doutorado em ciência dos alimentos). Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
62. SABBATINI, M.E. et al. Variation in exocrine pancreatic secretion in rats due to different commercial diets. **Lab Anim**, v. 35, n. 6, p. 41-9, 2006.
63. SANCHEZ-MUNIZ, F.J.; BASTIDA, S. Do not use the Friedewald formula to calculate LDL-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. **Eur J Lipid Sci Technol**, v. 110, n. 4, p. 295-301, 2008
64. SAVAGE, D.B.; SEMPLE, R.K. Recent insights into fatty liver, metabolic dyslipidaemia and their links to insulin resistance. **Curr Opin Lipidol**, v. 21, n. 4, p. 329-36, aug 2010.
65. SHERLOCK S.; DOOLEY J. Diseases of the Liver and Biliary System. Cap. 25: Nutritional and Metabolic Liver Diseases, p. 423-31, 11ª edição, 2002. Blackwell Science
66. SILVA, M.A.F. et al. Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 1145-55, 2008.
67. SRIVASTAVA, S.; CHAN, C. Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line. **Biotechnol Bioeng**, v. 1, n. 99(2), p. 399-410, Feb. 2008.
68. TAHA, A.Y.; RYAN, M.A.; CUNNANE, S.C. Despite transient ketosis, the classic high-fat ketogenic diet induces marked changes in fatty acid metabolism in rats. **Metab Clin Exp**, v. 54, p. 1127-32, 2005.
69. TINIAKOS, D.G.; VOS, M.B.; BRUNT, E.M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathology and Pathogenesis. **Annu Rev Pathol Mech Dis**, v. 5, p. 145–71, 2010.
70. WEIGERT, C. et al. Palmitate, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induces the Expression of Interleukin-6 in Human Myotubes through Proteasome-dependent Activation of Nuclear Factor-kB. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 23942–23952, 2004.

71. WANG, Z.Q. et al. Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet. **Metabolism**, v. 56, n. 12, p. 1635-42, 2007.
72. YANG, Z.H.; MIYAHARA, H.; HATANAKA, A. Chronic administration of palmitoleic acid reduces insulin resistance and hepatic lipid accumulation in KK-Ay Mice with genetic type 2 diabetes. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 120-8 , Jul. 2011.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**



O presente trabalho permite concluir que, dentre os fatores envolvidos na patogênese da DFGNA, os AG, especialmente os AG saturado palmítico e esteárico, os AG monoinsaturados palmitoléico e oléico e os AG poliinsaturados  $\alpha$ -linolênico, eicosapentaenóico e docosaexaenóico exercem uma importante influência, uma vez que estão envolvidos em processos relacionados à etiologia, à progressão e à reversão da EH. Desta forma, o cuidado com a ingestão equilibrada destes AG, de acordo com os padrões de recomendação nutricional, parece ser uma abordagem potencial para a prevenção e o tratamento da DFGNA.

Apesar das modificações na sua versão anterior, AIN-76A, a dieta AIN-93 foi apontada com indutora do quadro de EH observado nos animais no estudo experimental, sugerindo que a versão atual ainda não representa a formulação mais apropriada para os roedores de laboratório, especialmente na fase de crescimento.

Corroborando os achados descritos na literatura, o estudo experimental evidenciou a importância dos AG palmítico, esteárico, oléico e palmitoléico no contexto da EH. Em relação ao perfil lipídico sérico, no entanto, não foi observada associação com o perfil em AG do tecido hepático, tampouco com o quadro de infiltração gordurosa, encontrado no fígado dos animais.

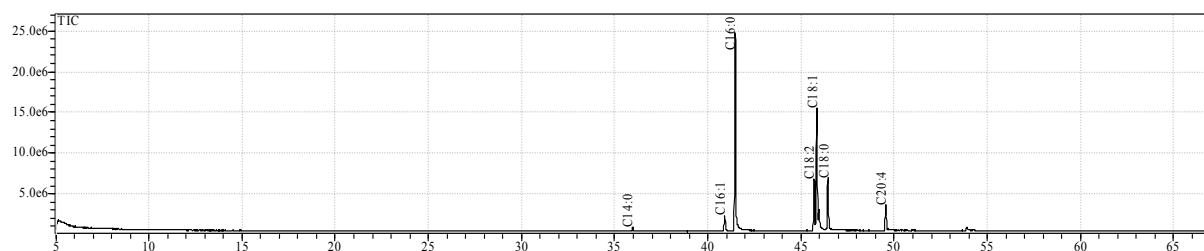
**REFERÊNCIAS**

1. ARAYA, J. et al. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Clin Sci**, v. 106, p. 635–643, 2004.
2. ATAÍDE, T.R. et al. Toxicological analysis of the chronic consumption of diheptanoin and triheptanoin in rats. **Int J Food Sci and Technol**, v. 44, p. 484-92, 2009.
3. BACON, B.R. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1103-9, oct. 1994.
4. BUETTNER, R. et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. **J Mol Endocrinol**, v. 36, p. 485–501, 2006.
5. DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-5, apr. 1998.
6. DUNN, W. et al. Suspected Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Mortality Risk in a Population-based Cohort Study. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 9, p. 2263–2271, 2008
7. DUVNJAK, M. et al. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 34, p. 4539-4550, sep. 2007.
8. GENTILE, C.L.; PAGLIASSOTTI, M.J. The Role of Fatty Acids in the Development and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 9, p. 567–576, sep. 2008.
9. HULBERT, A.J. et al. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. **Biol Rev**, v. 80, p. 155-69, 2005.
10. KLURFELD, D.M. Kidney and bladder stones in rodents fed purified diets. **J Nutr**, v. 132, n. 12, p. 3784, 2002.
11. LISTENBERGER, L.L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **PNAS**, v. 100, n. 6, p. 3077–3082, mar. 2003.
12. MARSMAN, H. A. et al. Reversal of hepatic steatosis by omega-3 fatty acids measured non-invasively by 1H-magnetic resonance spectroscopy in a rat model. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 26, p. 356–363, 2011.
13. MEAD, M.N. The Feed Factor. Estrogenic variability in lab animal diets. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 11, p. A640-2, 2006.
14. NISHITANI, Y. et al. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes. **Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi**, v. 42, n. 1, p. 32-5, feb. 2007.
15. PAN, D.A.; STORLIEN, L.H. Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats. **J Nutr**, v. 123, n. 3, p. 512-9, 1993.
16. PURI, P. et al. A Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 46, p. 1081-1090, out. 2007.

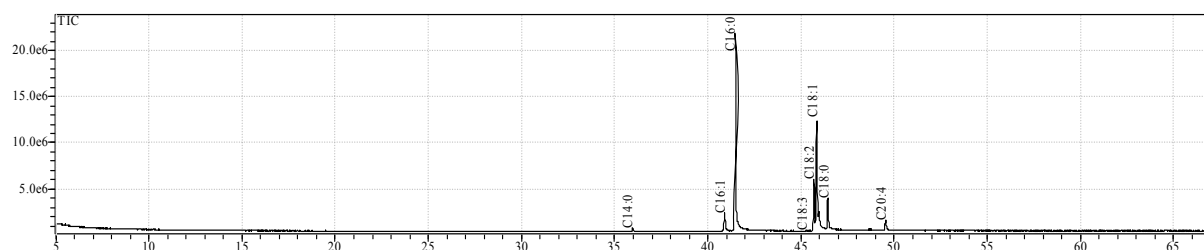
17. SABBATINI, M.E. et al. Variation in exocrine pancreatic secretion in rats due to different commercial diets. **Lab Anim**, v. 35, n. 6, p. 41-9, 2006.
18. SAKAGUCHI, S. et al. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. **Drug Metab Pharmacokinet**, v. 26, n. 1, p. 30-46, 2011.
19. SHERLOCK S.; DOOLEY J. Diseases of the Liver and Biliary System. Cap. 25: Nutritional and Metabolic Liver Diseases, p. 423-31 11<sup>a</sup> edição 2002. Blackwell Science
20. SILVA, M.A.F. et al. Efeito hepatoprotetor do consumo crônico de dieptanoína e trieptanoína contra a esteatose em ratos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 1145-55, 2008.
21. TETRI, L. H. et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, p. G987–G995, sep. 2008.
22. WEIGERT, C. et al. Palmitate, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induces the Expression of Interleukin-6 in Human Myotubes through Proteasome-dependent Activation of Nuclear Factor-κB. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 23942–23952, 2004.



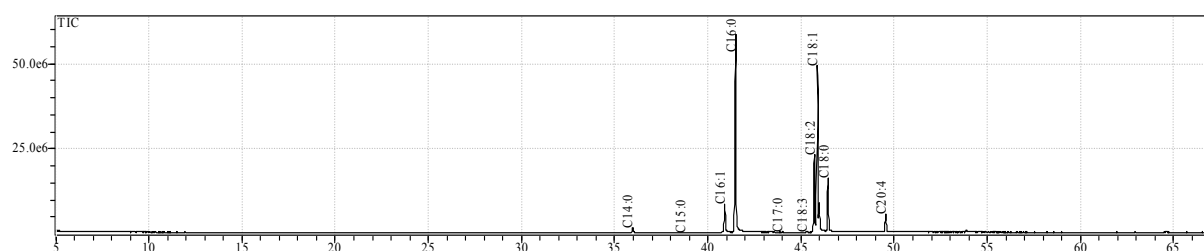
Cromatograma do animal 07 – AIN 1m



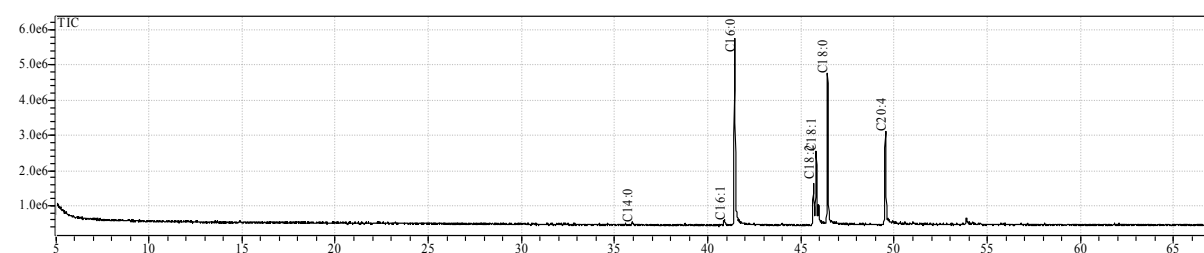
Cromatograma do animal 18 – AIN 1m



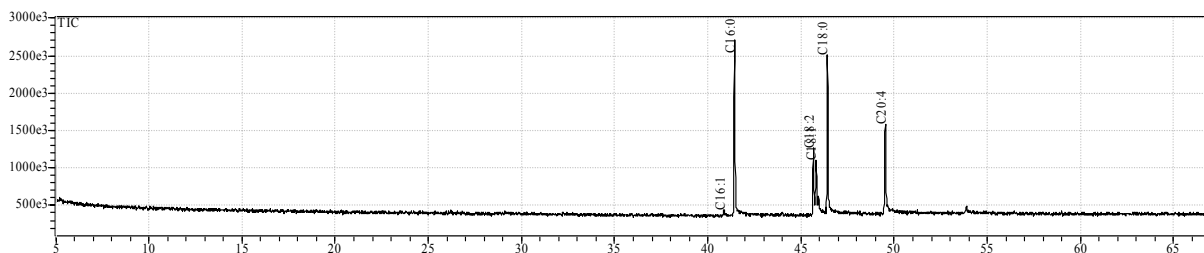
Cromatograma do animal 19 – AIN 1m



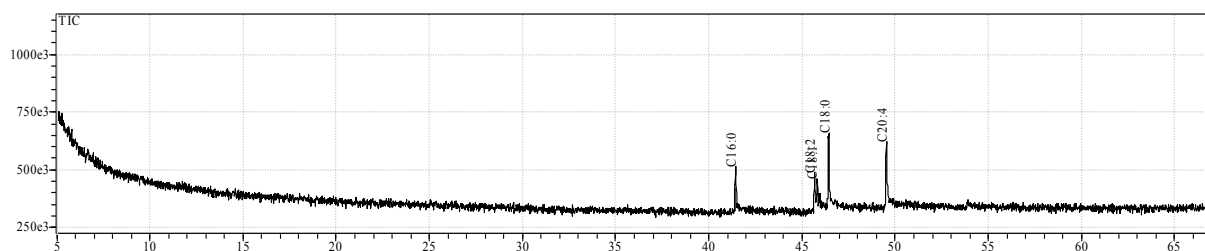
Cromatograma do animal 03 – DCo 1m



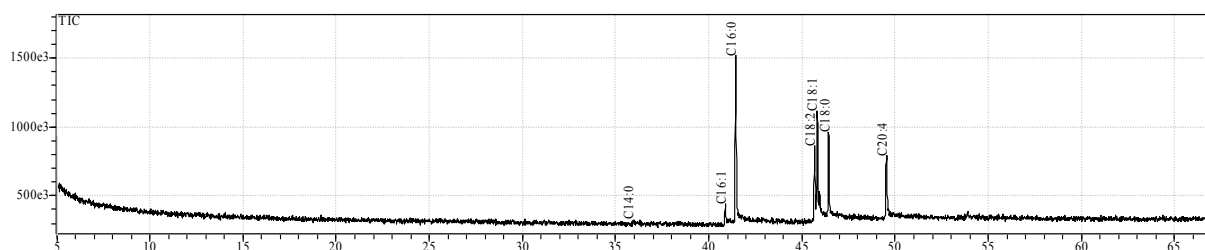
Cromatograma do animal 10 – DCo 1m



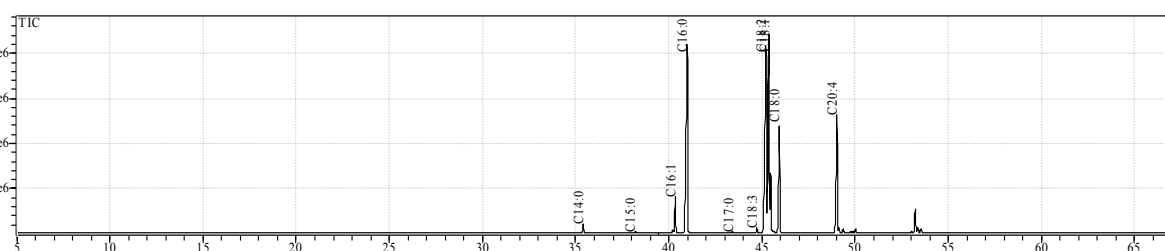
Cromatograma do animal 22 – DCo 1m



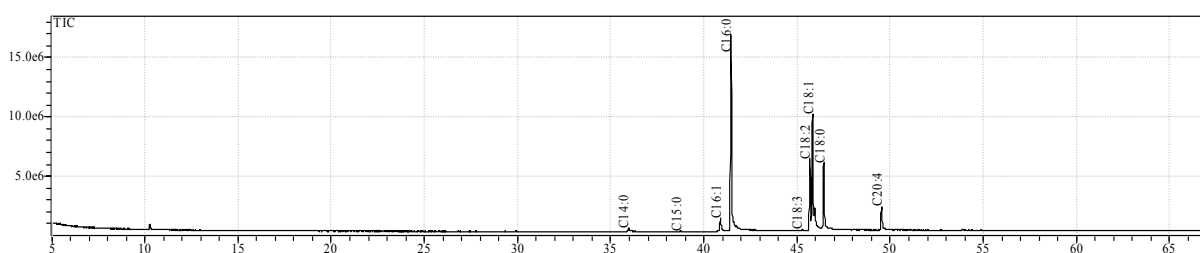
Cromatograma do animal 09 – AIN 4m



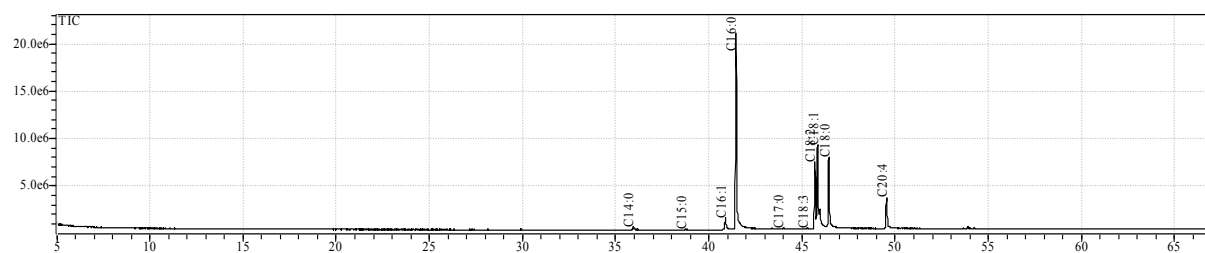
Cromatograma do animal 21 – AIN 4m



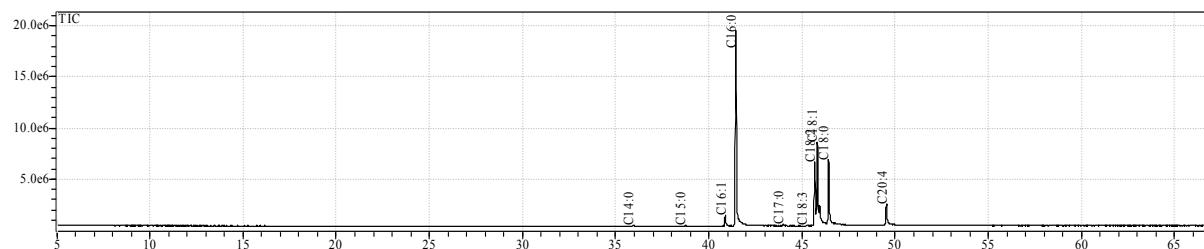
Cromatograma do animal 31 – AIN 4m



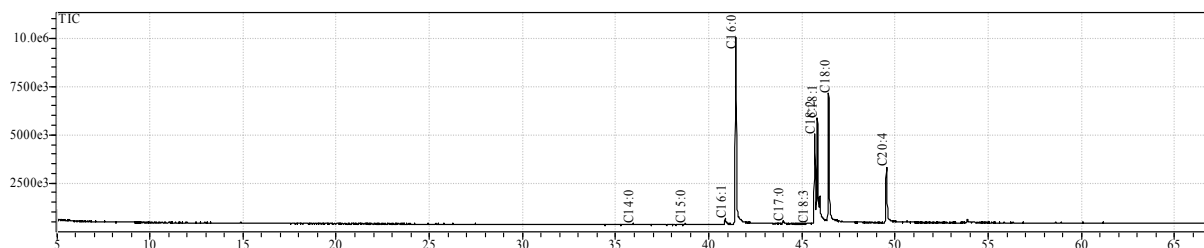
Cromatograma 10 do animal 17 – DCo 4m



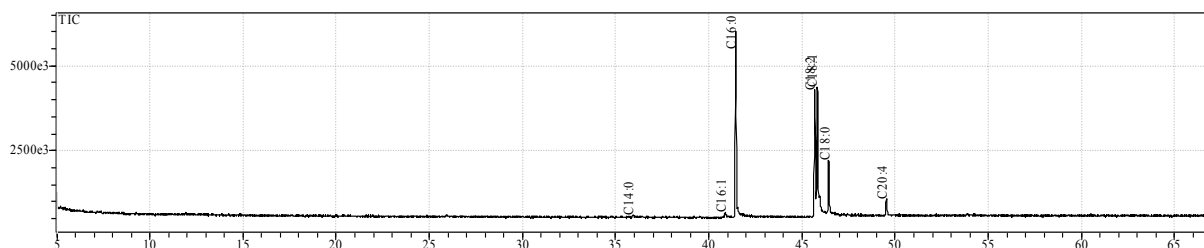
Cromatograma do animal 26 – DCo 4m



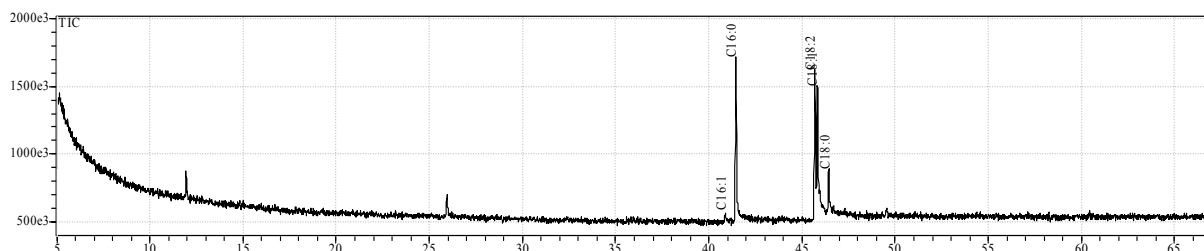
Cromatograma do animal 35 – DCo 4m



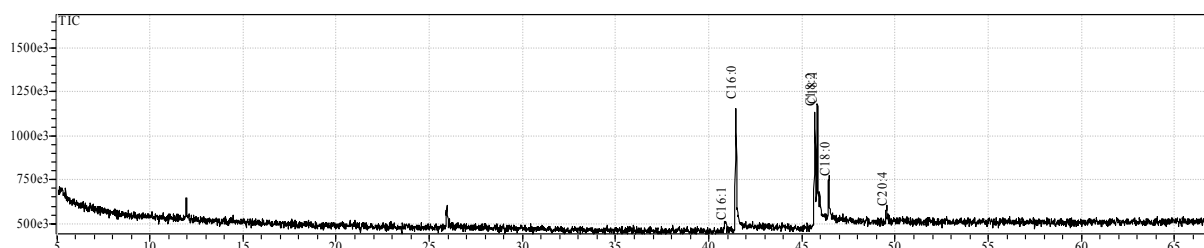
Cromatograma do animal 60 – AIN 1m



Cromatograma do animal 48 – AIN 1m

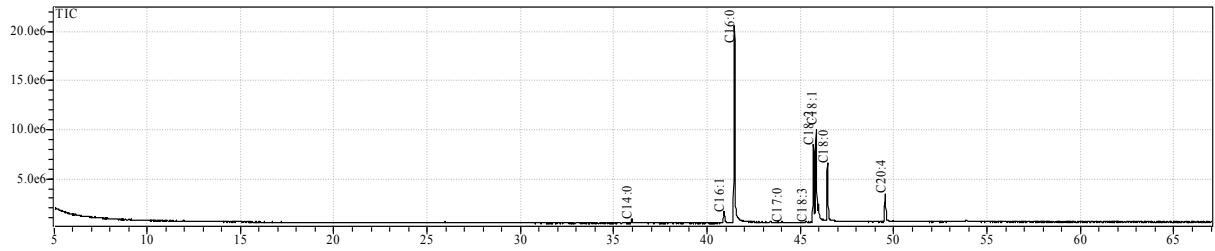


Cromatograma do animal 39 – AIN 4m

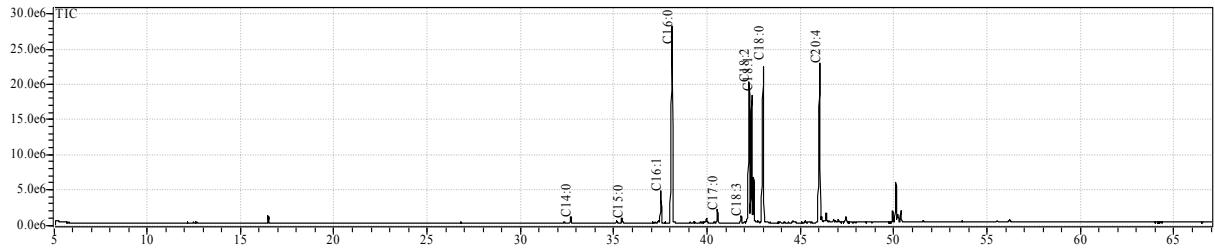




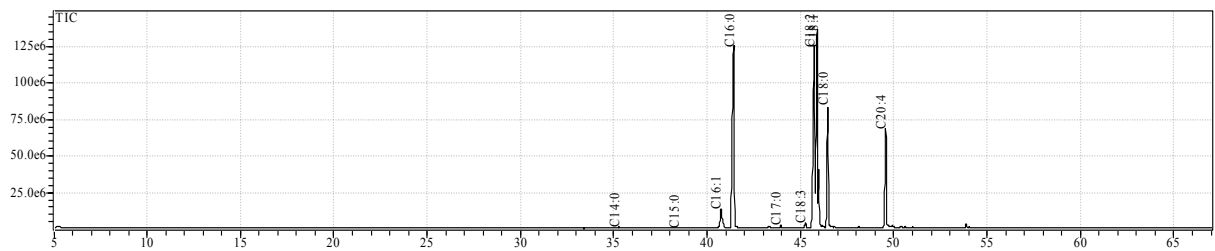
Cromatograma do animal 42 – AIN 4m



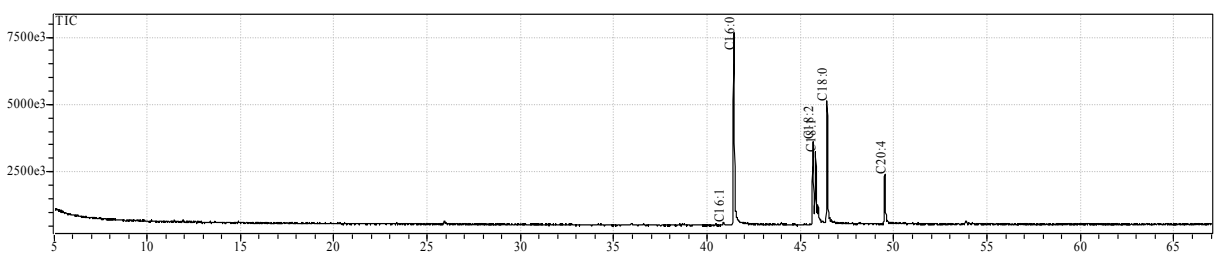
Cromatograma do animal 33 – DCo 1m



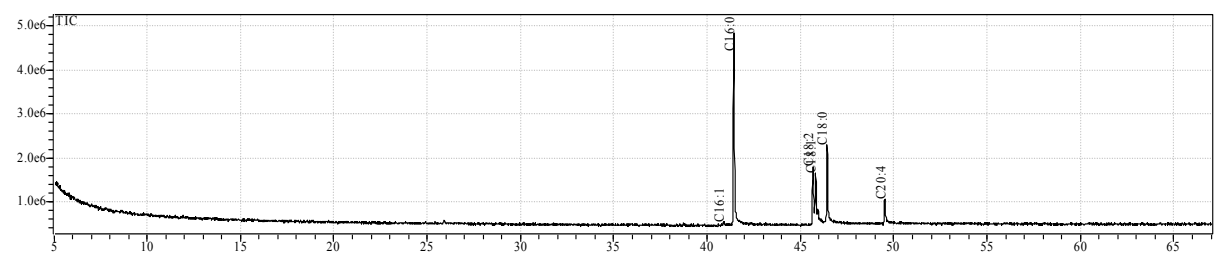
Cromatograma do animal 57 – DCo 1m



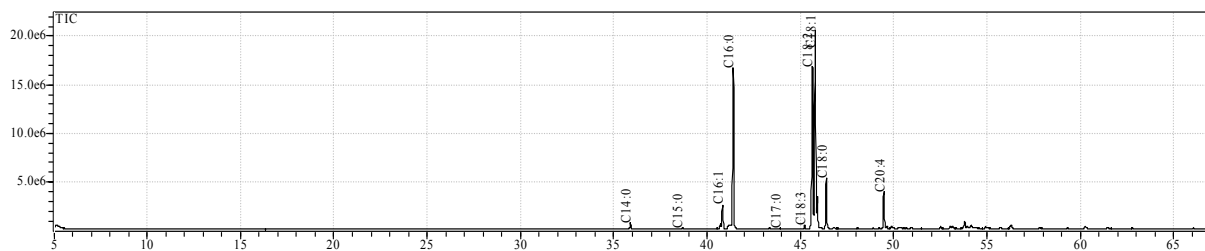
Cromatograma do animal 41 – DCo 4m



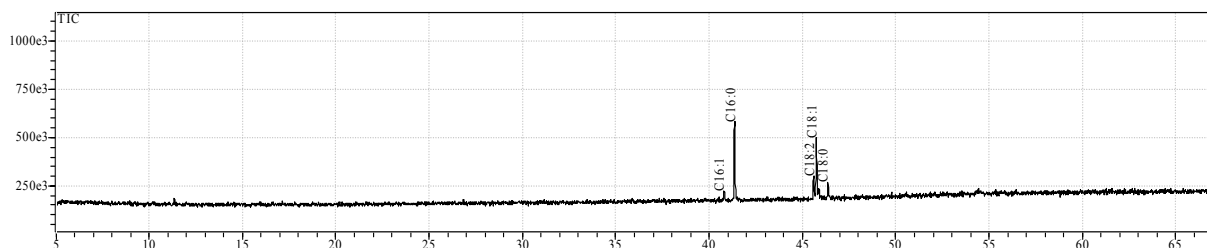
Cromatograma do animal 20 – DCo 4m



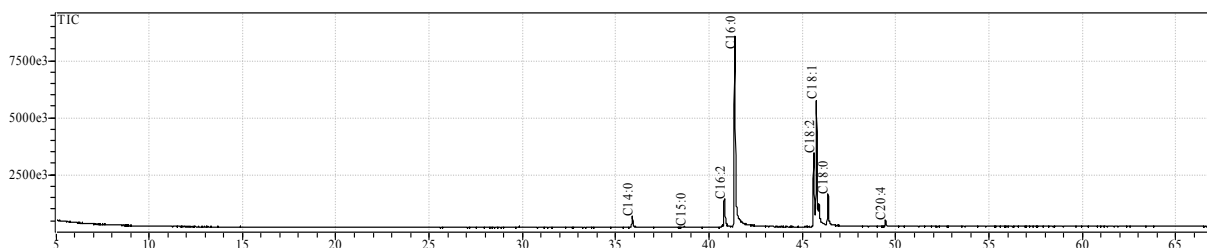
Cromatograma do animal 32 – DCo 4m



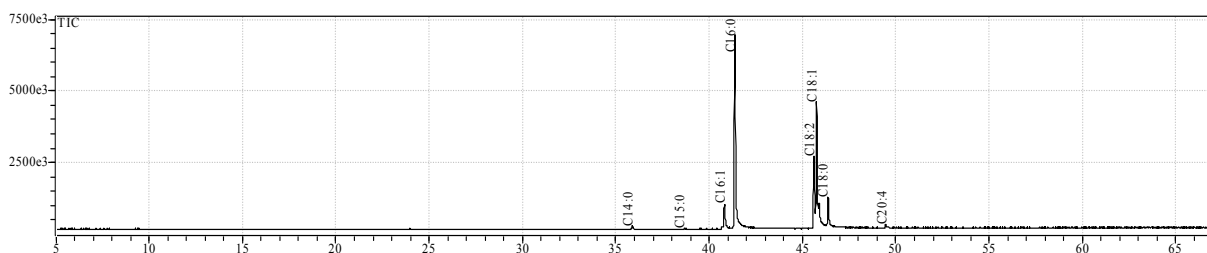
Cromatograma do animal 43 – AIN 4m



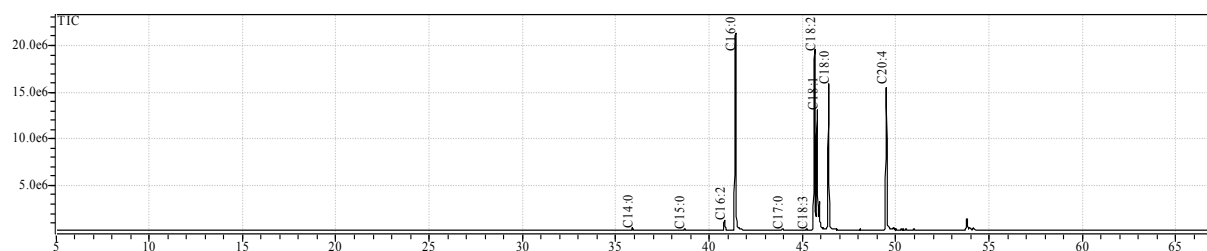
Cromatograma do animal 30 – AIN 1m



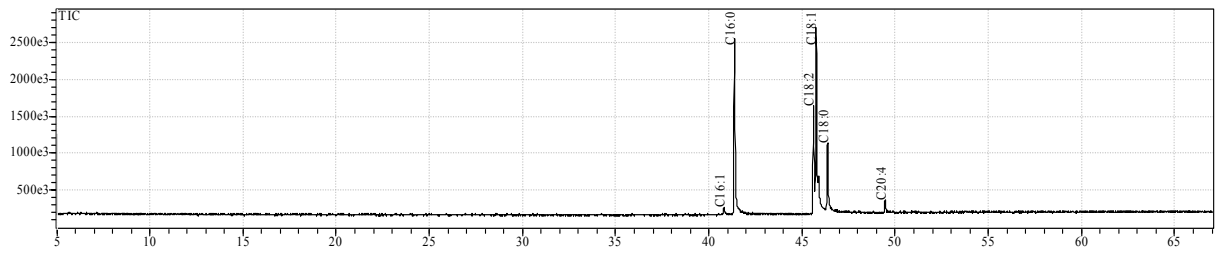
Cromatograma do animal 24 – AIN 4m



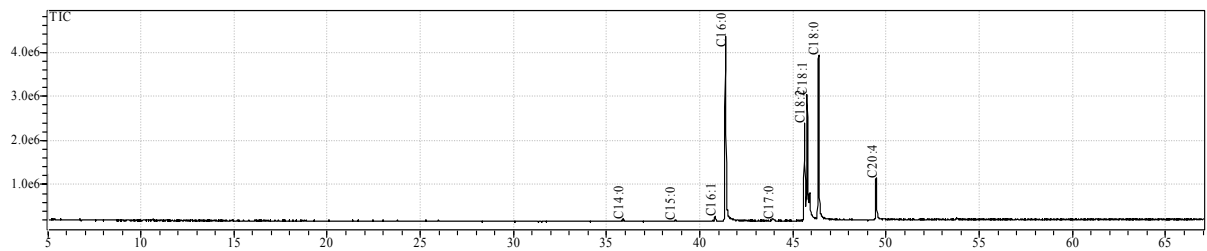
Cromatograma do animal 02 – DCo 4m



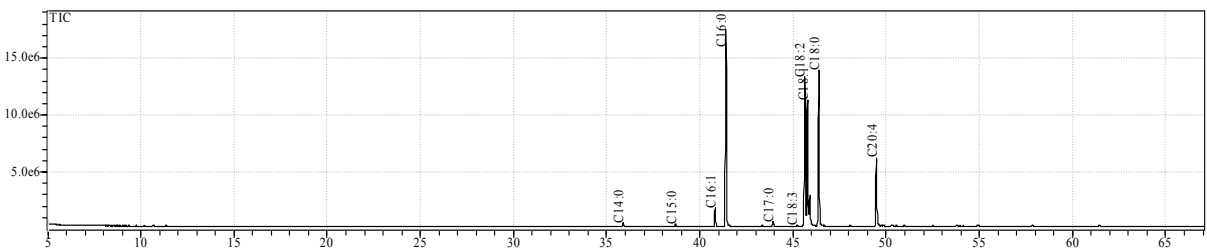
Cromatograma do animal 49 – AIN 1m



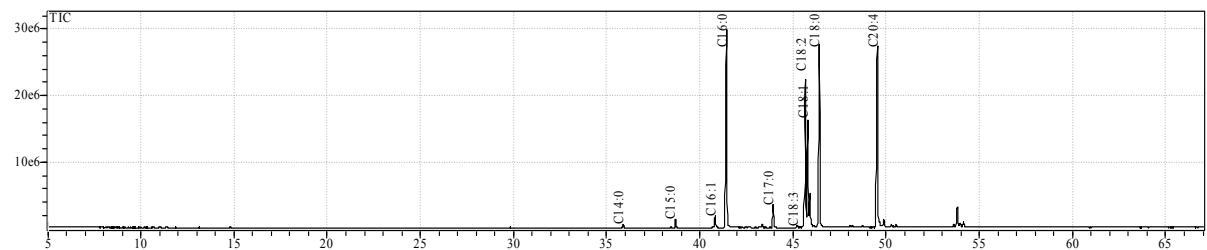
Cromatograma do animal 40 – DCo 1m



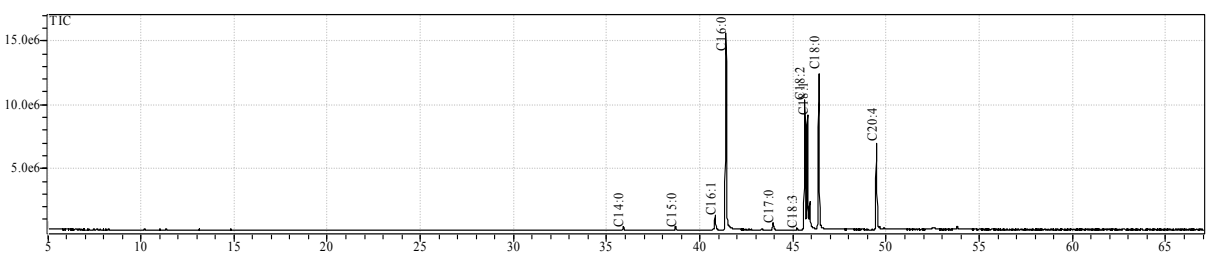
Cromatograma do animal 14 – DCo 4m



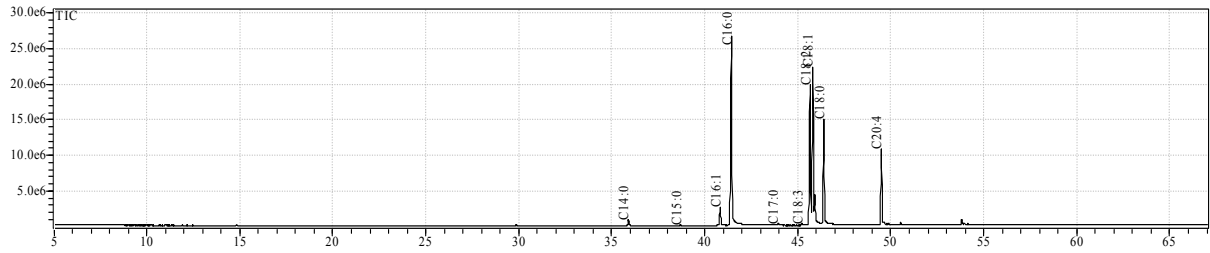
Cromatograma do animal 52 – DCo 4m



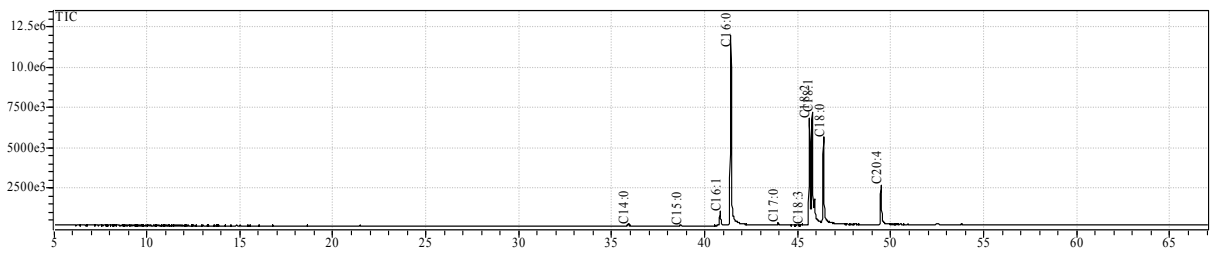
Cromatograma do animal 27 – DCo 1m



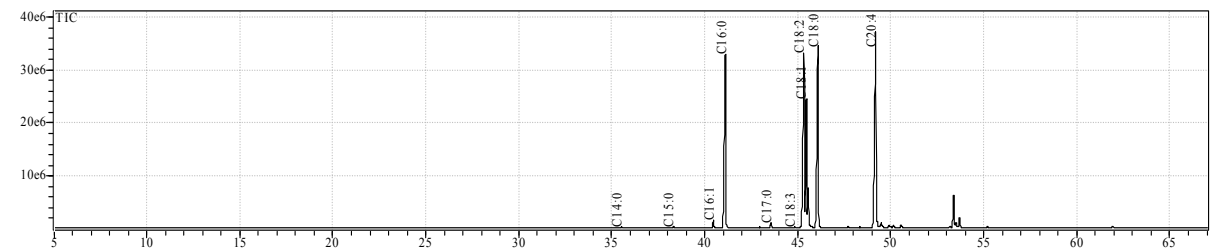
Cromatograma do animal 25 – AIN 4m



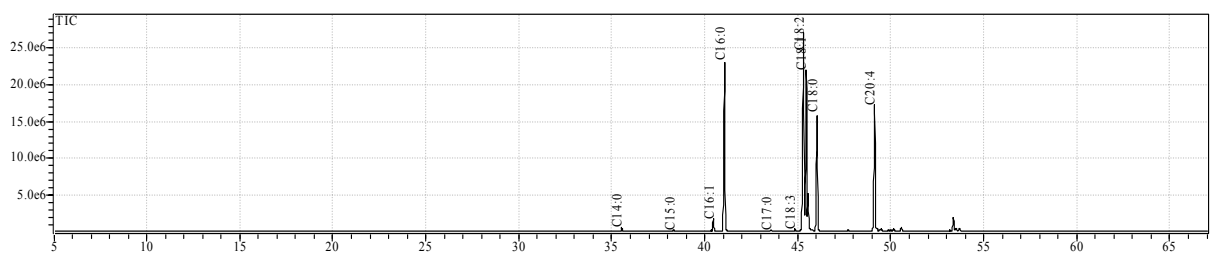
Cromatograma do animal 37 – AIN 1m



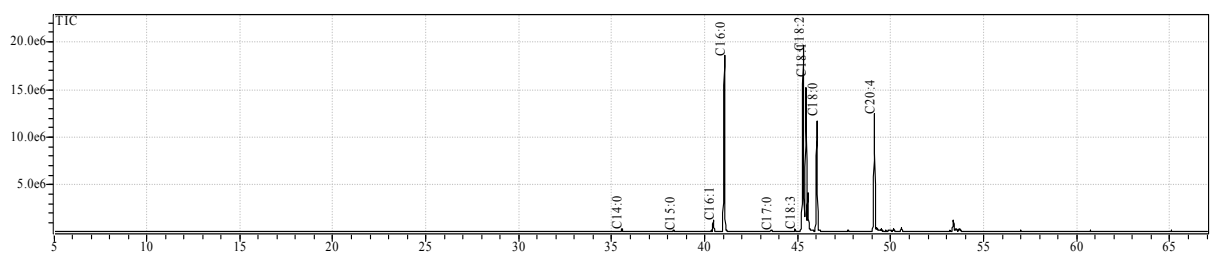
Cromatograma do animal 38 – DCo 4m



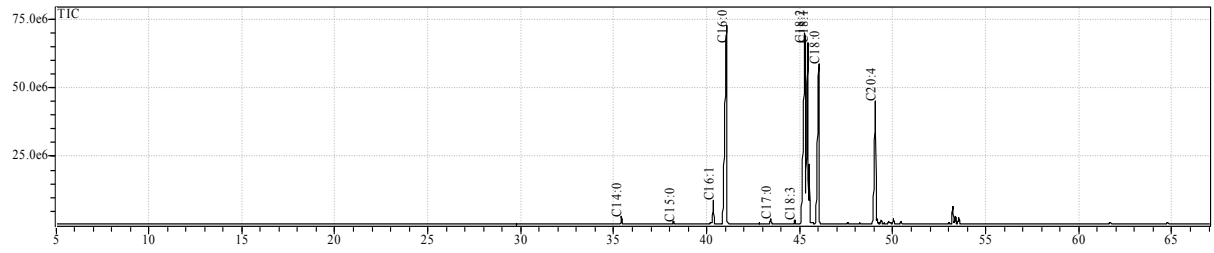
Cromatograma do animal 16 – AIN 4m



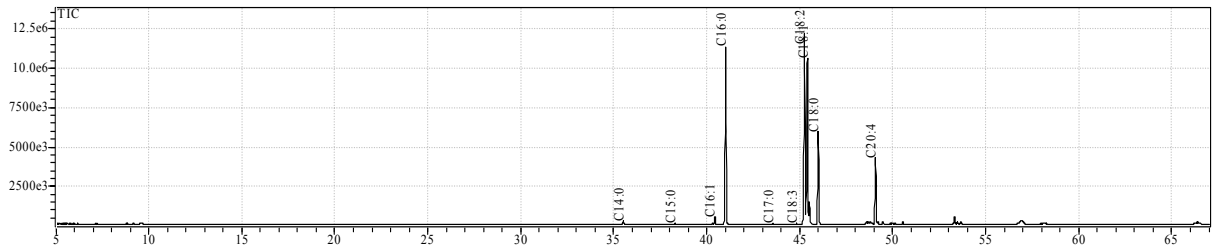
Cromatograma do animal 36 – AIN 1m



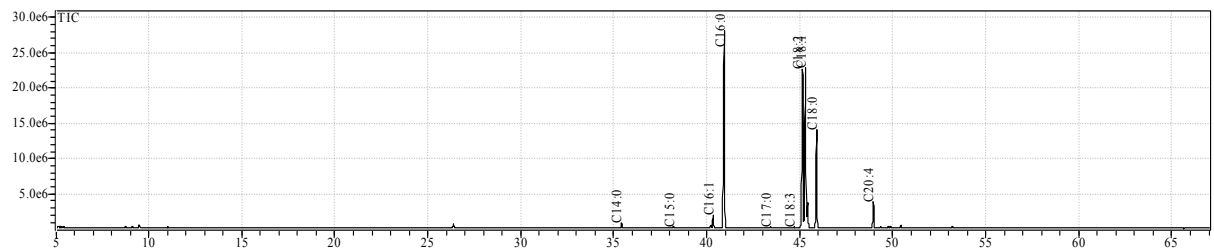
Cromatograma do animal 11 – DCo 4m



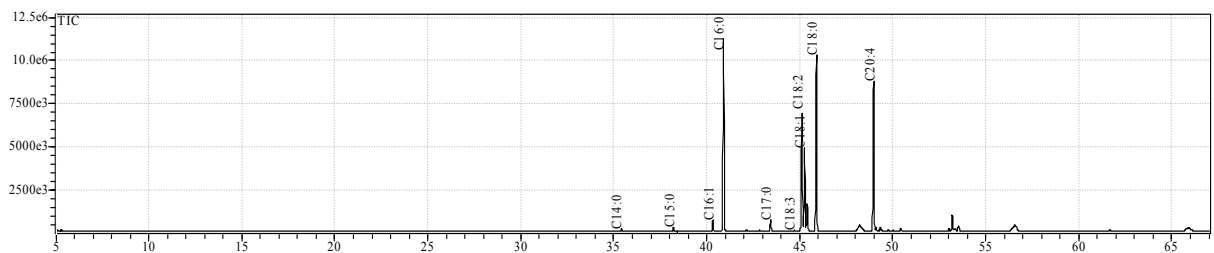
Cromatograma do animal 04 – AIN 4m



Cromatograma do animal 06 – AIN 1m



Cromatograma do animal 15 – DCo 1m







**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 09/03/2010

Senhor (a) Pesquisador (a), Terezinha da Rocha Ataíde  
Nassib Bezerra Bueno  
Airta Larissa Cerqueira Lima

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 09/03/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 004857/2009-20 sob o título **Perfil em ácidos graxos do tecido hepático de ratos submetidos a diferentes dietas padrão**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.c).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(\*) Áreas temáticas especiais